

**RADIOIMMUNOLOGISCHER NACHWEIS
VON THYREOGLOBULIN-ANTIKÖRPERN
BEIM MENSCHEN MIT EINER
DOPPELANTIKÖRPERMETHODE**

Victor Waller

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität

München

Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn

RADIOIMMUNOLOGISCHER NACHWEIS
VON THYROGLOBULIN-ANTIKÖRPERN
BEIM MENSCHEN MIT EINER
DOPPELANTIKÖRPERMETHODE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dipl. Chem. Victor Waller

aus

München

1982

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. H. THOENES
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1982



Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

A-	Anti-
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B/T%	Spezifische Bindung in Prozent
CFA	Complettetes Freund'sches Adjuvans
Ci	Curie (1 Curie = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
DEAE	Diethylaminoethyl
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
H-	Human-
IG, IgG	Immunglobulin
IIF	Indirekte-Immun-Fluoreszenz
^{125}J	Radioisotop ^{125}Jod
K-	Kaninchen-
M-	Mikrosomen
NS	Normal-Human-Serum
PBS	Phosphat-gepuffertes Kochsalz
PS	Patientenserum
RS	Referenzserum
SK	Serenkennzahl
Tg-	Thyreoglobulin
u-	Mikro-

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	3
2. Material und Methoden	6
2.1. Material	6
2.2. Methoden	
2.2.1. Isolierung und Reinigung des Thyreoglobulins	9
2.2.2. Methoden zum Reinheits- nachweis und zur Proteincharakterisierung	12
2.2.3. Tierexperimentelle Methoden	15
2.2.4. Radioimmunoassay	17
2.2.5. Indirekte Immunfluoreszenz	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Ergebnisse zur Präparation und Charakterisierung des Thyreoglo- bulins (Tg)	
3.2. Ergebnisse zum Radioimmunoassay (RIA)	
3.2.1. Ergebnisse zur Markierung des Tg	28
3.2.2. Ermittlung der Antigen- konzentration für den Assay	31
3.2.3. Ergebnisse zur Erstel- lung einer Kalibrierstan- dardkurve	34
3.2.4. Qualitätskontrolle des Radioimmunoassays	36

	Seite
3.3. Ergebnisse aus Immunfluoreszenzuntersuchungen (IIF)	38
3.4. Vergleich der Ergebnisse aus RIA und IIF	42
3.5. Klinische Ergebnisse	48
4. Diskussion	56
4.1. Methodik	56
4.2. Klinik	58
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung und Problemstellung

Seit den Veröffentlichungen von Roitt und Doniach (55) und Witebsky und Rose (72) in den Jahren 1956/57 und der zwischenzeitlich erreichten Verfeinerung immunologischer Methoden kam ein breites Interesse am Nachweis von Antikörpern in der Schilddrüsenserum-Diagnostik auf.

Hiervon zeugen u.a. Arbeiten über das Schilddrüsencarcinom (27,42), die hyper- oder atrophischen Thyreoiditiden (1,15,56), die endokrine Ophthalmopathie (34), den Morbus Basedow (1,17,45,49), sowie die primäre Hypothyreose und das Myxödem (2,37,48).

Sechs humorale Schilddrüsen-Antigen-Antikörpersysteme sind seither bekannt geworden: Antikörper gegen das Thyreoglobulin und das mikrosomale Antigen, Antikörper gegen das 2. Antigen des Kolloids (CA2) und den TSH-Rezeptor (LATS), Antikörper gegen das Zelloberflächen-Antigen sowie Antikörper gegen die an Haptene gebundene Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 .

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht insbesondere die Frage nach den Ursachen und der Pathogenese der autoimmunologischen Vorgänge bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Schilddrüse (6,32,53).

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache, daß Schilddrüsenantikörper auch bei Patienten mit blander Struma und sogar bei Gesun-

den, deren Verwandte an einer Immunthyreoiditis erkrankten, nachgewiesen werden konnten (7,67). Es ist untersucht worden, welche Bedeutung zirkulierende Schilddrüsenantikörper in Bezug auf die Funktion der Schilddrüse und bei der Pathogenese anderer Erkrankungen haben, z.B. bei Patienten mit rheumatischer Arthritis (5), Ophtalmopathie (34) oder Glomerulonephritis (31,51), bei denen auch hohe Tg-Antikörper-Spiegel festgestellt wurden.

Zum Nachweis von Thyreoglobulin-Antikörpern (Tg-Ak) stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die sich allerdings in ihrer Spezifität und/oder Sensitivität deutlich unterscheiden. Wenig empfindlich sind der Präzipitationstest in Gelen (10,47), der Latexpartikeltest (Thyro-Welco-Test; Fa. Wellcome) und die Komplementfixierung (2). Empfindlicher und damit für die Klinik eher geeignet sind der semiquantitative "Boyden-Test" (8) nach der Methode der Passiven Hämagglutination (TCHA) (1,24,41) und der qualitative, immunhistologische Tg-Ak-Nachweis mittels Indirekter Immunfluoreszenz (IIF).

Allen diesen Methoden gemeinsam ist eine unbefriedigende Quantifizierbarkeit der zu bestimmenden Tg-Antikörpermenge im Serum - da lediglich Verdünnungstiter bestimmt werden - und eine relativ geringe Empfindlichkeit (30). Ob letzteres auch für die Methode der Indirekten Immunfluoreszenz gilt, wird u.a. in dieser Arbeit geprüft.

Radioimmunoassay (RIA) und Enzymimmunoassay (ELISA) bieten bessere Möglichkeiten einer empfindlichen, quantifizierbaren Messung von Antikörperspiegeln

im Serum, obgleich bei diesen Verfahren aufgrund der hohen Empfindlichkeit mit größerer Störanfälligkeit gerechnet werden muß (44,45).

Dies gilt insbesondere für die radioimmunologische Bestimmung von Thyreoglobulin-Antikörpern, was in der Literatur über den Kompetitiven Radioimmunoassay und die Bestimmungsmethode mit der "Solid-Phase-Technik" mehrfach berichtet wird (3,35,38).

In der vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an die Arbeiten anderer Autoren (7,49,52,59) ein Radioimmunoassay als Doppelantikörpermethode beschrieben, bei dem es um die Ausarbeitung eines praktisch verwendbaren "Screening-Test" und einer Standardmeßmethode geht.

Die damit gewonnenen Meßergebnisse werden den parallel dazu bestimmten qualitativen Befunden nach der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz gegenübergestellt und im klinischen Teil anhand von Diagnosen auf ihre klinische Relevanz hin untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Reagenzien

Ammoniumsulfat	Boehringer, Mannheim
EDTA	
Glycin	
Agarose	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	
Chloramin-T	
Cyanbromid	
Diäthylbarbitursäure	
-Aminocaprinsäure	
Freund'sches Adjuvans (DIFCO)	
Glycin	
Kaliumjodid	
Kaliummono-, di-hydrogensulfat	
Natriumazid	
Natriumbicarbonat	
Natriummehabisulfit	
Sacharose	
Wasserstoffperoxidlösung 30%-ig	
Fluorescein-Isothiocyanat	BBL, USA
Na- ¹²⁵ Jodid	New England Nuclear
RBS - 50	Roth, Karlsruhe
	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Acrylamid-N,N'methylenbisacrylamid (BIS)	
Ammoniumpersulfat (PER)	
Coomassie-Brilliant Blue R 250	
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	
Siliconlösung	

Referenzsubstanzen

Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Anti-Human-Serum (Ziege)	Hyland
Anti-Human-Serum (Pferd)	
Anti-Human-Ig-Fraktion (Ziege)	
Standard-Tg-Antikörper-Poolserum	Henning, Berlin
Fluorescein-Isothiocyanat	Wellcome
Anti-Human-IgG	
Schafsblut	

Gele

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Ultragel AcA 22,34

DEAE-Cellulose

Sepharose 4B, 6B

Sephadex G 25, 50, 75, 200

Geräte

Ultra-Turrax-Homogenisator TP 18/10	
Ultrafiltrationszelle	Millipore
Druckfilter XM 300, X 100	Amicon
Luer-Lock-Spritzen	Pharmaseal Laboratories
PVC-Cups, Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf
Mikrozentrifuge	
Mikrotiterplatten	Bio-Rad.
Disc-Elektrophorese	
Entfärbekammer und Rundgele	
Zentrifuge: Spinco L 50 (21)	Beckmann
RC 2 B	
Dialysierschlauch	Kalle AG
Lyophilisator	
Gammazähler	Packard

Photometer	Zeiss AG
Zeiss-Mikroskop	
mit PLOEM-Ultraviolett-Beleuchtung	
Fraktionssammler	LKB
Ultrarac 7000 Uvicord II	

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung des Thyreoglobulins

Die Gewinnung des Tg erfolgt in Anlehnung an die von Bodlaender (7), Dunn (17) und Feldt-Rasmussen (21) beschriebenen Methoden.

Salinische Extraktion (14)

Die bei -36°C eingefrorenen Schilddrüsen thyreo-ektomierter Patienten werden aufgetaut, von Sehnen und Fett befreit, in 2-3 mm große Stücke geschnitten und pro 1g kolloidales Gewebe in 10ml 0,25m Sucrose-PBS-Lösung pH = 7,4 (0,02% Natriumazid) mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und 18 Std. bei 4°C inkubiert, anschließend durch Gaze gefiltert und 30 Min. in einer 2-Liter-Beckmann-zentrifuge bei 4°C und 10 000rpm zentrifugiert.

Fraktionierte Salzfällung

Durch fraktionierte Fällung in 36 bzw. 43%-iger Ammoniumsulfatlösung im Eisbad (71) wird das Tg aus obiger Lösung extrahiert.

Der bei 38 000rpm abzentrifugierte zweite Rückstand wird in PBS aufgenommen und gegen destilliertes Wasser und 0,02m Phosphat-Puffer pH = 7,2 jeweils 24 Std. dialysiert, anschließend in einer Ultrafiltrationszelle (Millipore) auf eine Proteinkonzentration von ca. 50 g/l konzentriert.

Gelchromatopographie

Die Tg - Rohfraktion wird versuchsweise auf verschiedenen zur Trennung hochmolekularer Substan-

zen geeigneten Sephadex-, Sepharose-Gelchromatographiesäulen AcA 34, AcA 22 und Sepharose 6B chromatographiert.

Zur Auffindung des Tg-Proteins in den einzelnen Peaks werden die Spitzenfraktionen jeweils mit Tg-Antikörper enthaltendem Serum nach der Methode von Ouchterlony (s. 2.2.2.) untersucht.

Affinitätschromatographische Reinigung des Tg

Da das über Sepharose 6B im zweiten Peak (s.3.1.) enthaltene Thyreoglobulin Verunreinigungen mit Serumproteinen ähnlicher Molekülgröße bis zu 0,4% enthalten kann (21), wird es einer affinitätschromatographischen Reinigung unterzogen. (10)

Herstellung der Immunadsorptionssäule

Als Immunoadsorbens diente sowohl käufliches (Fa. Pharmacia) als auch selbst aktiviertes Sepharose 4 B Gel. Je 1ml gequollene Sepharose 4 B wird mit 150mg Cyanbromid bei alkalischem pH = 8,5 nach der Methode von Cuatrecasas (11) aktiviert. Die Kopplung der heterologen Proteine erfolgt nach Waschen des aktivierten Gels mit 0,001 N Salzsäure im Kopplungspuffer mit 0,1m Natriumcarbonat-0,5m Natriumchloridlösung pH = 8,5 im batch-Verfahren bei Raumtemperatur (3 Std.).

Je 10g Trockengewicht aktivierter Sepharose 4 B werden mit 50mg Kaninchen-IgG-Anti-H-IgG oder 10ml Kaninchen-Antihumanserum bzw. 6ml Ziegen-Antihumanserum der Fa. Hyland (6,8mg/ml Protein) beladen.

Das beladene Gel wird vor Gebrauch in 1 M Glycinlösung (pH = 8,0) 60 Min. inkubiert und danach

mit Acetatpuffer 1 M NaCl pH = 4 und 0,1 M Boratpuffer 1 M NaCl pH = 8 gewaschen. Nach Äquilibrierung in 0,02 M Phosphatpuffer 0,1 M KCl pH = 7,4 wird jedes Immunadsorptionsgel in einer Säule (300 x 19mm) gepackt und die jeweilige Bindungskapazität von H-IgG und Serumproteinen bestimmt (0,5mg Protein/ml Gel).

1. Eluationspuffer für das gereinigte Tg:
0.1 M KCl, 0,02 Phosphatpuffer pH = 7.7
2. Eluationspuffer der adsorbierten Serumproteine:
0.1 M Glycin/HCl - Puffer pH = 2.8.

Gefriertrocknung

Zur Herstellung von Eichproteinen und zur längeren Aufbewahrung wird salzfreies Thyreoglobulin bei -20°C zuerst tiefgefroren und dann im Lyophilisator unter Hochvacuum gefriergetrocknet. Zur weiteren Verwendung wird das Protein in PBS gelöst. (10)

Konzentrationsbestimmung

Die Antikörperkonzentration wird anhand von H-IgG-Eichproteinen photometrisch bestimmt. Das Standard-Tg-Ak-Protein wird im RIA ausgetestet. Die Antikörperkonzentrationen der zu untersuchenden Patientenserum werden auf die Meßwerte dieses Standard-Antikörpers bezogen ausgedrückt in E/ml.

Eine Einheit ist definiert als das Äquivalent zu 30ng des Standard-A-Tg-IgG . (52)

2.2.2. Methoden zum Reinheitsnachweis und zur Charakterisierung des isolierten Human- Thyreoglobulins

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Antigenlösungen und verdünnten Antiseren, sowie nicht konzentrierter IgG-Globulinlösungen wird nach der Methode von Lowry (40) bestimmt. Als Vergleichsstandard dient IgG- und Tg-Eichprotein. Tg in stark verdünnter Lösung und I^{125} markiertes Thyreoglobulin wird bei 280nm unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 10,0$ gemessen (60).

Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wird in Anlehnung an eine Vorschrift von Maurer (43) durchgeführt.

3.75 prozentige Acrylamid-NN'-methylen-bis-acrylamidsuspensionen werden in 120 x 9mm Kunststoffröhrchen mit N,N,N', N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED) und Amoniumpersulfat (PER) polymerisiert. Die mit 1% Bromphenolblau angefärbte Proteinlösung verdichtet sich in dem ca. 10mm hohen Sammelgel zu einer scharfen Bande (ca. 5 Min. bei 30mV) und trennt sich im dichterporigen Trenngel im diskontinuierlichen pH und Spannungsgradienten entsprechend der unterschiedlichen Ladung und Molekulargewicht in die einzelnen Komponenten auf.

Die Betriebsspannung beträgt ca. 110mV, die Stromstärke pro Gelröhrchenquerschnitt 5-6mA.

Nach Erscheinen der Farbbande am unteren Ende der Trennröhrchen werden die Gele mit einem Stempel herausgedrückt und mit einer 0,25% Coomassie-

Blue-Lösung, die zu 5 Teilen aus Methanol, 1 Teil Eisessig und 1 Teil Aqua dest. besteht, gefärbt. Das Entfärben des Gels erfolgt mit dem gleichen Lösungsmittel.

Stammlösungen für das verwendete Gelsystem sind:

- Lösung 1: 30.0 g Acrylamid
0.8 g Methylenbisacrylamid (Bis)
- Lösung 2: 12.0 g Acrylamid
0.4 g Bis
- Lösung 3: 36.3 g Tris
0.23 ml TEMED (s.o.)
- Lösung 4: 5.7 g Tris
0.46 ml TEMED
+ Orthophosphorsäure bis pH 6.7
- Lösung 5: 0.14 g Amoniumpersulfat (PER)
- Lösung 6: 0.20 g PER
- Lösung 7: 6.85 g Tris
0.46 ml TEMED
48.0 ml 1 N HCl
- Lösung 8: 4.95 g Tris
0.46 g TEMED
39 ml Orthophosphorsäure

Lösung 1 - 8 jeweils auf 100 ml mit Aqua dest. (H_2O_{dest}) aufgefüllt.

Für das Gelsystem pH 8.9, 3.75 prozentig wird verwendet:

Sammelgel:	Trenngeld:
1 Teil Lsg. 2	1 Teil Lsg. 1
1 Teil Lsg. 4	1 Teil Lsg. 3
1 Teil H_2O_{dest}	1 Teil H_2O_{dest}
4 Teile Lsg. 6	4 Teile Lsg. 5

Elektrodenpuffer: 0.6 g Tris
2.88 g Glycin
(1:10 verdünnt) auf 1 l mit H_2O_{dest} aufgefüllt,
pH 8.3

Probenpuffer: 0.05 M Tris-Phosphat pH 6.7
+ 20% Saccharose

Für das Gelsystem pH 7.5, 3.75 prozentig wird
verwendet:

Sammelgel:	Trenngel:
1 Teil Lsg. 2	1 Teil Lsg. 1
1 Teil Lsg. 8	1 Teil Lsg. 7
1 Teil H_2O_{dest}	1 Teil H_2O_{dest}
4 Teile Lsg. 6	4 Teile Lsg. 5

Elektrodenpuffer: 5.52 g Diäthylbarbitursäure
1.0 g Tris
(1:10 verdünnt) auf 1 l mit H_2O_{dest} aufgefüllt,
pH 7.0

Probenpuffer: 0.05 M Tris-Phosphat pH 5.5
mit Orthophosphorsäure einge-
stellt
+ 20% Saccharose

Immundiffusion

Die Doppelte Immundiffusion wird nach dem von Ouchterlony entwickelten Verfahren (47) in 1% Agarose in 0,02 Na-Barbitalpuffer pH = 8,5 auf Objektträgern durchgeführt. Die Löcher in dem 2mm dicken Gel werden mit einem Stempel kreisförmig - um ein zentral liegendes Loch angeordnet - ausgestochen.

Probenmengen: 2-10ul Lösung entsprechend 1-2ug Antigenprotein bzw. 0,2-0,6mg Serumprotein
Diffusionsdauer: 24-48 Std. bei 4°C.

2.2.3. Antigenzubereitung - Tierexperimentelle Methoden

Darstellung der Immunglobuline

Humanes IgG und Kaninchen-IgG werden aus Seren durch Ammoniumsulfatfällung bei 36% Sättigung und zur chromatographischen Reinigung über eine aktivierte DEAE-CELLULOSE Anionenaustauschersäule (300 x 25mm) gewonnen (71). Für je 10ml Serum werden 20g DEAE-Cellulose-Trockengewicht eingesetzt.

Die Eluation erfolgt mit Natriumphosphatpuffer in Konzentrationsgradienten von 0,01 - 0,2 M bei pH = 8,1 und 4°C.

Immunisierung

Von den Proteinlösungen Tg, H-IgG (4-8g/l) und Humanserum werden je 0,5ml mit 1,5ml Komplettem Freund'schem Adjuvants(CFA) emulgiert. Die Emulgierung erfolgt durch Hin- und Herbewegung des Gemisches in einer 5ml-Luer-Lockspritze, die über einen Dreiweghahn mit einer zweiten Spritze verbunden ist. Die Stabilität der Emulsion wird auf der Oberfläche kalten Wassers geprüft. Die Emulsion wird direkt vor der Applikation bei 4°C vorgenommen.

Die Immunisierung erfolgt mit Kanülen Nr. 12 in die hinteren Fußsohlen und den Nacken von Kaninchen nach folgendem Immunisierungsschema:

Tabelle 1: Immunisierungsschema

Vorgang	Tage	Antigen- menge/mg	Serum- menge/ml	Bemerkung
1. Injektion	1	4,0		
2. Injektion	3	1,0		
1. Boostern	10	1,0		
1. Testserum	16		3	Ohrvene
2. Boostern	17	0,5		
2. Testserum	23		6	Ohrvene
3. Boostern	24	0,5		
1. Blutentnahme	30		15-20	Ohrvene
4. Boostern	31	0,5		
2. Blutentnahme	35-36		40-60	Herz- punktion

Das Blut wird über die äußere Ohrvene oder durch Herzpunktion gewonnen.

Nach Gerinnung bei 37°C 60 Min wird das zentrifugierte Serum bei 56°C 30 Min. inaktiviert und bei -20°C tiefgefroren.

2.2.4. Radioimmunoassay nach der Doppelantikörper- methode für H-Tg-Autoantikörper

Radioisotopenmarkierung

Die Isotopenmarkierung des gereinigten H-Tg erfolgt nach zwei verschiedenen Methoden.

Laktoperoxidasemethode (36,46)

100 μ l H-Tg-Lösung (= 100 μ g H-Tg) in azidfreiem 0,1 M KCl, 0,02 M Phosphat-Puffer und 0,1% BSA pH = 7,5 enthaltendem Puffer wird mit 50 μ l Laktoperoxidase in gleichem Puffer mit 10 μ l $10^{-3}\%$ Wasserstoffperoxidlösung versetzt. Dazu werden 20 μ l Na- 125 Jodid (= 0,5 mCi) pipettiert und 1 Minute geschüttelt.

Gestoppt wird die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l einer Lösung, die 1,6g Sucrose und 0,1g Kaliumjodid enthält.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Eppendorf-Gefäß mit einem Stück Dialysierschlauch abgedeckt und in einem mit 1l PBS gefüllten Becherglas 24 Std. dialysiert, oder, wie Abb. 8 in 3.2.1. zeigt, über eine Sephadex G 75 Gelsäule von nicht gebundenem 125 Jodid gereinigt.

Chloramin-T-Methode (26,63)

10 μ l (= 0,5 mCi) Na- 125 Jodid werden in einem spitzen Reagenzglas vorgelegt. Dazu gibt man 40 μ g H-Tg in PBS und 10 μ l Chloramin-T (2,5 g/l). Nach 30g Schütteln wird die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l Natriummetabisulfit (2,5 g/l) gestoppt. Die Abtrennung des markierten Proteins von freiem 125 Jodid erfolgt durch das Auftragen des Reaktionsgemisches auf eine mit Sephadex G 25 gefüllte

Glassäule, die mit einer 0,1%-igen albuminhaltigen PBS-Lösung inkubiert wird (0,9 x 100 mm). Als Vorlage dienen Eppendorfgefäße, die ebenfalls mit 50 ul des gleichen Puffers beschickt sind.

Sowohl der Peak des markierten Proteins als auch der des freien ^{125}J odid wird im Gammazähler bestimmt (s. Abb. 9 in 3.2.1.). Das Protein wird bei 280 nm gemessen. $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10,0$ (60).

Radioimmunoassay nach der Doppelantikörpermethode

Prinzip

Das RIA-Verfahren besteht aus folgenden Teilschritten:

Erstens: Besetzen der freien Bindungsstellen des Tg-spezifischen Antikörpers in Patientenserum durch zugegebenes ^{125}J -H-Tg-Protein.

Zweitens: Abtrennen des freien von antikörpergebundenem ^{125}J -Tg durch Ausfällung des ^{125}J -Tg-Autoantikörperkomplexes mit Zweitantikörper. (Doppelantikörpermethode)

Drittens: Zählen des im Immunkomplex gebundenen ^{125}J im Gammazähler.

Testansatz (ausgeführt in Eppendorf Plastikgefäßen 1,5ml)

60 ul Standardpuffer (PBS)

20 ul Serumprobe (Kalibrator) 1:20 verdünnt
in 5% Human-Normal-Serum/PBS

20 ul Tracer 1:100 in 0,1% BSA/PBS-Lösung
(20ng Tg- ^{125}J) s. 3.2.1.

Vortex-Schütteln

Inkubation 60 min. bei 37°C

100 ul 2. Antikörper 1:2 PBS verdünnt

Vortex-Schütteln
Inkubation 18 Std. bei 4°C
Zentrifugieren bei 10000 rpm
(Beckmann-Zentrifuge)
Abpipettieren von 100 ul Überstand
Messen des abpipettierten Über-
standes von Patientenserum- (PS),
Referenzserum- (RS) und
Normalserumproben (NS) und
des restlichen Überstandes
+ Pellet im Reaktionsgefäß im
Gammazähler.

Als Kalibrator dient ein kommerziell erhältliches
Standard-Poolserum Antikörper-positiver Patien-
ten, das 1mg/ml Tg-Ak-IgG enthält (Fa. Henning,
Berlin).

Tracer ist das gereinigte isotopenmarkierte
Thyreoglobulin, das in 0,1%-iger BSA-PBS-Lösung
verdünnt vorliegt (100 ug $^{125}\text{J-H-Tg/ml}$) Spezi-
fische Aktivität: 10 mCi/mg Tg.

Zweitantikörper

Zur Standardisierung des RIA wird ein Antiserum
der Fa. Hyland Goat-Anti-H-IgG (4,8mg/ml) ver-
wendet.

Dieses Serum ist spezifisch für Human-IgG (H-Kette).

Antigenkonzentration

Um den Einfluß endogener Thyreoglobulinspiegel in
den Serumproben auf den RIA zu berücksichtigen,
kann der Standardpuffer für die quantitative Be-

stimmung der Tg-Antikörper einen Zusatz an nicht markiertem "kaltem" Thyreoglobulin in einer Konzentration von 0.2 ug/ml. enthalten. Das Screening der Seren erfolgt bei 10ng Tg/ul Serumprobe.

Auswertung

Die spezifische Antigen-Antikörper-Bindungskapazität wird in % Bindung berechnet nach:

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{cpm}_{\text{PS,RS}} - \text{cpm}_{\text{NS}}}{\text{cpm}_{\text{total}}} \times 100$$

Bezogen auf die Standardverdünnungskurve lassen sich die gemessenen % Bindung in E/ml umrechnen. Eine Einheit ist definiert als das Äquivalent zu 30ng des Standard-A-Tg-IgG des Kalibrators. Liegt eine Serumprobe außerhalb des steilsten Bereichs der Standarddeichkurve (s. 3.2.3.), so wird das Serum zur Bestimmung der Einheiten pro ml in größeren Verdünnungen (1:40, 1:100, 1:200..) nochmals im Testansatz gemessen.

Es werden neben den unbekannten Patienten-Testseren (PS) je ein Referenzserum (RS) mit einem bekannten Tg-Ak-Gehalt im oberen Meßbereich, sowie ein Human-Normalserum (NS) zur Messung der unspezifischen Fällung als Triplet mitbestimmt.

2.2.6. Untersuchungen nach der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz

Alle Seren - mit Ausnahme der Human-Normalseren - , deren Tg-Ak-Gehalt mit dem oben beschriebenen RIA gemessen wird, wurden auch nach der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz untersucht.

Prinzip

Bei dieser Methode werden Gefrierschnitte von menschlicher Schilddrüse (mit Methanol fixiert zum Nachweis von Tg-Antikörpern, ohne Fixierung zum Nachweis von Mikrosomen-Antikörpern) mit Patientenseren überschichtet und 30 Min. inkubiert. Die Autoantikörper gegen die Schilddrüsen-Mikrosomen bzw. das H-Tg im Kolloid werden durch fluoreszenzmarkiertes Ziegen-Anti-H-IgG (Travenol-Hyland) (Zweit-Antikörper) immunhistologisch identifiziert.

Durchführung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thoenes für die Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen im Immunbiologischen Labor der Medizinischen Klinik Innenstadt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse zur Präparation des Thyreoglobulins (Tg)

Der Extrakt von Tg, der mit Amoniumsulfat gefällt ist, wird nach Dialyse und Druckdialyse zur Abtrennung von hochmolekularen Verunreinigungen wie z.B. IgM und IgG der Gelfiltration an verschiedenen Gelen wie Aca 34, Sepharose 6B, Aca 22 unterworfen.

Abb. 1-3 zeigen die Eluationsprofile der einzelnen Gelfiltrationen.

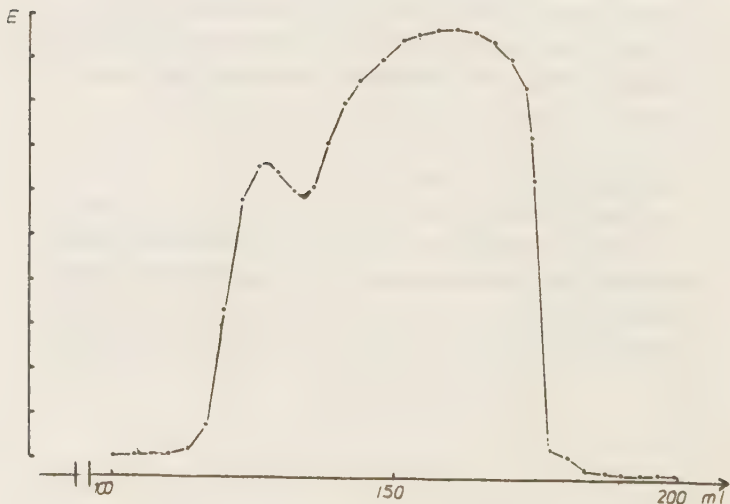


Abb. 1: Eluationsprofil des Tg-Extrakts nach Amoniumsulfatfällung von einer Aca 34 Gelchromatographiesäule

Ordinate: Extinktion bei 280nm

Abszisse: Milliliter Eluat

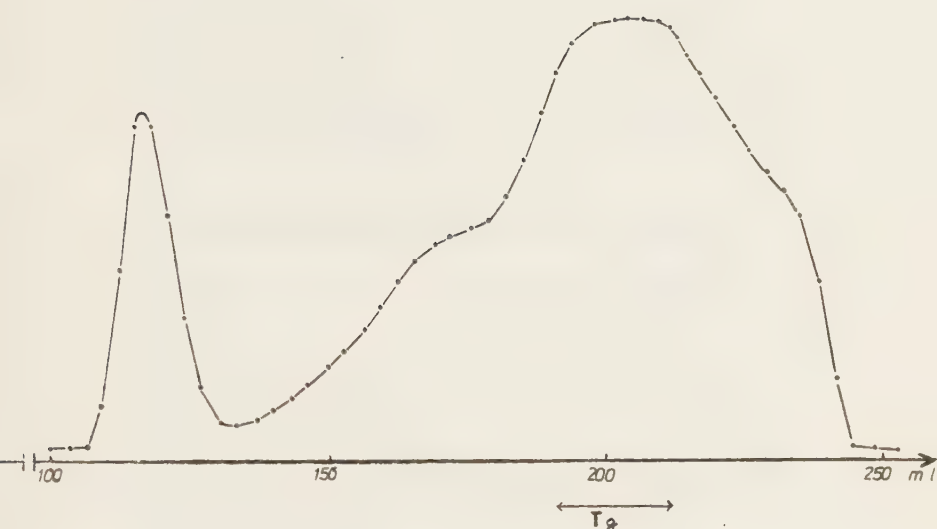


Abb. 2: Eluationsprofil des Tg-Extrakts nach
Amoniumsulfatfällung von einer Sepharose
6 B Gelchromatographie

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

Abszisse: Milliliter Eluat

Wie aus dem 1. Eluationsprofil in Abb. 1 ersichtlich ist, ergibt das AcA 34 Agarose-Acrylamid-Gelgemisch nicht die erwünschte Auftrennung des hochmolekularen Substanzgemisches.

Dagegen trennt die Sepharose 6B in Abb. 2 die IgM-Fraktion von dem zweiten Peak, der das Thyreoglobulin in den Spitzenfraktionen enthält - wie aus der Disc-Elektrophorese und Immundiffusion hervorgeht -, quantitativ ab.

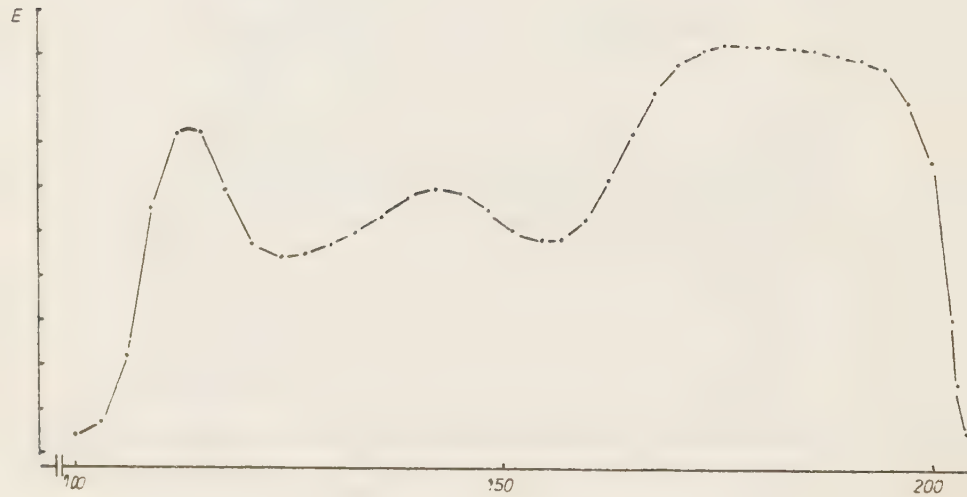


Abb. 3: Elutionsprofil des Tg-Extrakts nach Amoniumsulfatfällung von einer AcA 22 Gelchromatographiesäule

Ordinate: Extinktion bei 280 nm
Abszisse: Milliliter Eluat

Die AcA 22 - Gelchromatographiesäule bewirkt eine noch bessere Abtrennung des Thyreoglobulin im 3. Peak von den in Abb. 2 in der Schulter des 2. Peak enthaltenen Serumproteinen. Aufgrund der Trenneigenschaften des Gelgemisches wird dies jedoch mit einer größeren Verunreinigung des H-Tg mit IgG erkauft, wie die Breite des 3. Peaks in Abb. 3 zeigt.

Aus diesem Grund werden - wie in Abb. 2 angegeben - aus mehreren Sepharose 6B - Läufen die das Tg enthaltenden Fraktionen gepoolt, druckdialysiert, und zur Beseitigung von Spuren anderer Serumproteine ähnlicher Molekülgröße affinitätschromatographisch weiter gereinigt.

Affinitätschromatographische Reinigung des Tg

Die Darstellung der Affinitätschromatographie-säule ist in den Methoden 2.2.1. beschrieben.

Das Ziel des Reinigungsschrittes ist die Abtrennung von Haptoglobin (0,01 g/l), IgG (0.126 g/l), und möglichen geringfügigen Verunreinigungen von IgM (0.03 g/l) und α_2 -Makroglobulin (0.01 g/l), total maximal 0.4% im Eluat nach Sepharose 6 B - Gelchromatographie (21).

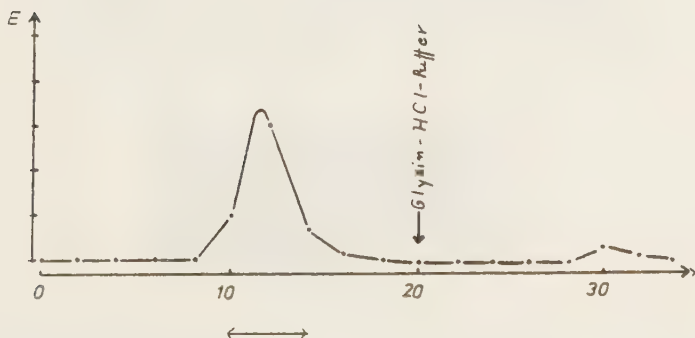


Abb. 4: Affinitätschromatographische Reinigung des Tg. Eluationsprofil von einer Anti-Human-serum - Sepharose 4B-Säule

Ordinate: Extinktion bei 280 nm
Abszisse: Anzahl der Fraktionen
Pfeil: gepoolte Fraktionen

Ergebnisse zur Bestimmung der Reinheit des Thyreoglobulins

Das affinitätschromatographisch gereinigte Tg zeigte in der Disc-Elektrophorese eines 3.75%igen Polyacrylamid-Rundgels eine einzige scharfe Bande. Da eine photometrische Messeinrichtung zur Auswertung von Elektrophoresen in Rundgelen nicht zur Verfügung stand, konnte dieser Befund durch ein Absorptionsspektrogramm nicht dokumentiert werden.

In den Ouchterlonytests präzipitierte das gereinigte Tg nur mit Antiseren für Tg.

Abb. 5 zeigt das Präzipitationsverhalten des Tg mit einem homologen und einem heterologen Antiserum. Abb. 6 soll zeigen, daß das gereinigte Tg im Ouchterlonytest keine Präzipitation mit Antiseren für menschliche Serumproteine eingeht. Aus Abb. 6 und 7 folgert die Spezifität des Anti-Tg-Serums, das u.a. in Abb. 5 verwendet wurde.

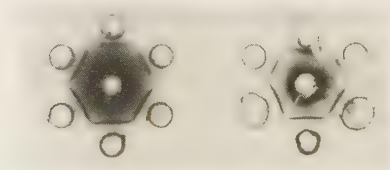


Abb. 5: Präzipitation des Thyreoglobulins mit einem homologen und einem heterologen Antiserum im Ouchterlonytest. Serum von einem Patienten mit Thyreoiditis-Hashimoto (linkes Zentrum) und Serum eines mit gereinigtem Tg immunisierten Kaninchens (rechtes Zentrum) diffundieren gegen Thyreoglobulin verschiedener Konzentration.

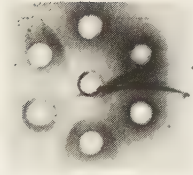


Abb. 6: Biologischer Reinheitsnachweis des verwendeten Thyreoglobulins im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest

Tg im Zentrum diffundiert gegen Antiseren für H-IgM (1), α_2 -Makroglobulin (2) von der Ziege, H-Serum (3) vom Pferd, H-Serum (4) von der Ziege, und gegen Anti-Tg-Serum von zwei selbst immunisierten Kaninchen (5 u. 6).

Die Seren in Abb. 6 und 7 sind im Uhrzeigersinn bei 12.00 Uhr = (1) angefangen aufgetragen.

Die Präzipitationsbanden zwischen den Randlöchern beruhen auf Kreuzreaktionen der verwendeten Antiseren untereinander (z.B. zwischen Pferd und Ziege, Ziege und Kaninchen).



Abb. 7: Immunbiologischer Reinheitsnachweis des Anti-Tg-Serums im Ouchterlonytest

H-IgG im Zentrum diffundiert gegen Antiseren für gereinigtes Tg (1 u. 2) s. Abb. 6 (5 u. 6), H-Serum (3) vom Pferd, H-Serum (4) von der Ziege, H-IgG vom Kaninchen (5) und der Ziege (6).

3.2. Ergebnisse zum Radioimmunoassay

3.2.1. ¹²⁵Jodid-Markierung des Thyreoglobulins

Berechnung der spezifischen Aktivität

Die Markierung der gereinigten Tg-Präparationen erfolgt nach den in 2.2.4. beschriebenen Methoden.

Die spezifische Aktivität des markierten Proteins errechnet sich aus der am Protein gebundenen Aktivität und der Menge des eluierten Proteins.

Für die Proteinmarkierung nach der LPO-Methode zeigt Abb. 7 das Elutionsprofil über eine Sephadex G 75-Chromatographiesäule (9 x 200 mm).

Gesamtaktivität 738 000 cpm (0,5 mCi)

Aktivität des H-Tg-Proteins 422 000 cpm = 57,2%
(uptake)

Menge des eluierten Proteins 78 ug

Spezifische Aktivität 3.5 uCi/ug H-Tg

Die durch TCA-Fällung bestimmte spezifische Bindung beträgt 93%.



Abb. 8: Abtrennung des freien ^{125}I Jodid vom markierten Tg über eine Sephadex-G 75-Säule
 Ordinate: cpm/Minute
 Abszisse: Anzahl d. Fraktionen
 Pfeil: gepoolte Fraktionen

Mit der Chloramin T-Methode wird ein höherer ^{125}I Jod-Einbau bis zu 86% erreicht.

Für Untersuchungen zur kompetitiven Verdrängung endogenen H-Tg's aus Seren mit hohen Tg-Spiegeln können so spezifische Aktivitäten von 30 uCi/ug Protein erzielt werden.

Die spezifische Bindung nach dieser Methode liegt nach Eluation über eine Sephadex G 25 9 x 200 mm Säule bei 98,5% (Abb. 9).

Aufgrund der höheren spezifischen Bindung und des guten Jodeinbaus durch Cloramin T wurde dieses Verfahren für die serienmäßigen Bestimmungen bevorzugt.



Abb. 9: Abtrennung des freien ^{125}Jod vom markierten Thyreoglobulin über eine Sephadex G 25 Säule nach Cloramin T Methode

Ordinate: Counts pro Minute

Abszisse: Anzahl der Fraktionen

Pfeil: gepoolte Fraktionen

3.2.2. Ermittlung der für den Radioimmunoassay optimalen Antigenfällungskonzentration (4)

Die Antigen-Antikörper-Immunpräzipitation im freien Puffersystem ist abhängig von der Konzentration und dem molaren Verhältnis beider Komponenten. In der Literatur wird dieses mit 1 bzw. bis 1.6 angegeben (66), was einer linearen Tg-Anti-Tg-Kette entsprechen würde.

Zur Bestimmung einer optimalen Tg-Konzentration im vorliegenden Assay sind außer der Konstanthaltung der Reaktionsbedingungen zwei Kriterien zu berücksichtigen:

1. Eine ausreichende Empfindlichkeit des Radioimmunoassay, die den Normalbereich mit erfaßt
2. Ein mäßiger Antigenüberschuß, der die Schwankungen der endogenen Tg-Spiegel in den zu untersuchenden Seren mit berücksichtigt.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Assay werden eine Reihe von schwach positiven und stark positiven Seren bei verschiedenen Tg-Konzentrationen im RIA untersucht (s. Abb. 10).

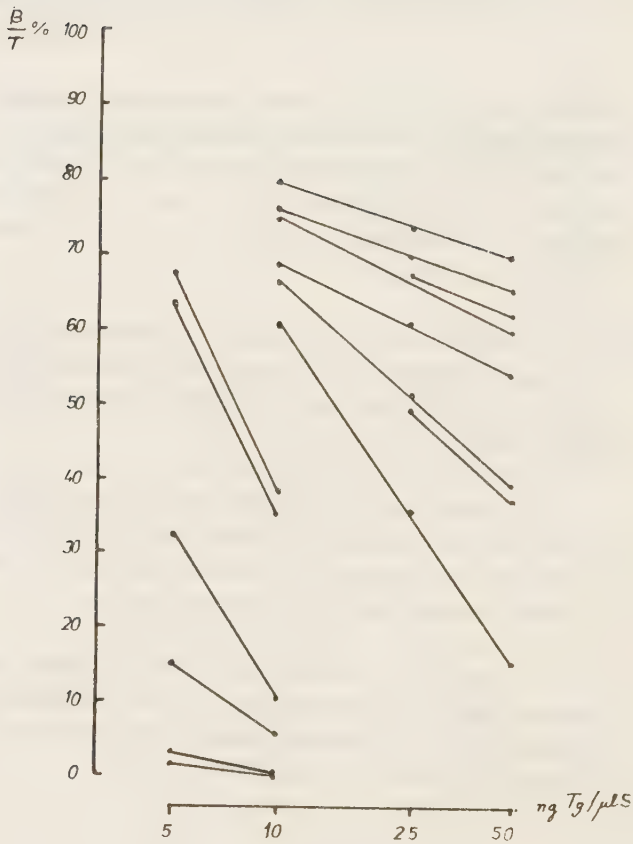


Abb. 10: Austestung Tg-Antikörper-haltiger Seren bei unterschiedlichen Antigen-Konzentrationen im RIA

positiv: N=12 negativ: N= 2

Ordinate: spezifische Fällungsraten

Abszisse: Tg-Konzentration ng/ul Serum-
probe, logarithmischer Maßstab

Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit der radioimmunologischen Bestimmung für Tg-Antikörper von der Antigenkonzentration.

Ausgehend von einer Ag-Konzentration (25ng/ul Serumprobe) steigt die Empfindlichkeit des RIA bei abnehmender Menge des eingesetzten Thyreoglobulins. Dies trifft in besonderem Maße für schwach positive Seren zu. Gleichzeitig wird jedoch bei niedrigen Ag-Konzentrationen die Differenzierung stark positiver Seren dadurch erschwert, daß diese im Bereich hoher spezifischer Bindung nahe beieinander liegende Werte aufweisen, was einer quantitativen Bestimmung des Tg-Antikörpergehalts dieser Seren (s. 3.2.3.) abträglich ist.

Außerdem ist bekannt, daß Tg-Antikörper-positive Seren und Seren von Gesunden endogenes Thyreoglobulin enthalten können.

Van Herle et al. (28) und Schneider et al. (62) haben Thyreoglobulinkonzentrationen in Normal- und Patientenserum bestimmt. Danach erreicht das Tg im Serum Konzentrationen im Normbereich bis 0.06ug/ml, bei erhöhten Werten bis 2ug/ml.

Deshalb wird für die folgenden radioimmunologischen Bestimmungen eine Antigenfällungskonzentration gewählt, die einen mäßigen Tg-Überschuß bei ausreichender Empfindlichkeit des Assay gewährleistet:

- a. für 'screening'-Tests 10ng Tg/ul Serumprobe
- b. zur quantitativen Bestimmung 20ng Tg/ul Serumprobe. Stark positive Seren, über 60% spezifischer Fällungsrate werden zusätzlich in höherer Verdünnung gemessen.

3.2.3. Ergebnisse zur Erstellung einer Standardeichkurve

Abb 11 zeigt eine Kalibrierverdünnungskurve des in 2.2.4. beschriebenen Radioimmunoassays bei semilogarithmischer Auftragung der zugegebenen Standardproteinmenge.

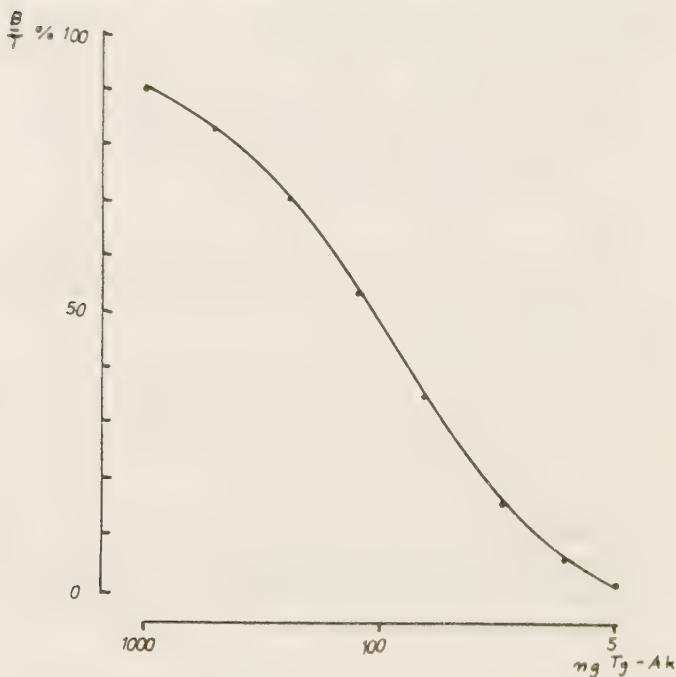


Abb. 11: Kalibrierstandardkurve zur Tg-Antikörperbestimmung

Untere Nachweisgrenze 5ng Tg-Ak/Ansatz

Antigen-Verdünnung: 20ul Thyreoglobulin
1:2000 verdünnt (10ng)

Serum-Verdünnung: 20ul
1:20 verdünnt

Ordinate: % Tracerbindung

Abszisse: Menge des Tg-Antikörpers/Ansatz

Für die Bestimmung erhöhter Tg-Antikörperspiegel oberhalb 60% spezifischer Fällungsrate werden die Seren bei größeren Verdünnungen gemessen. (Oberhalb des steilsten Bereichs der Standardkurve)

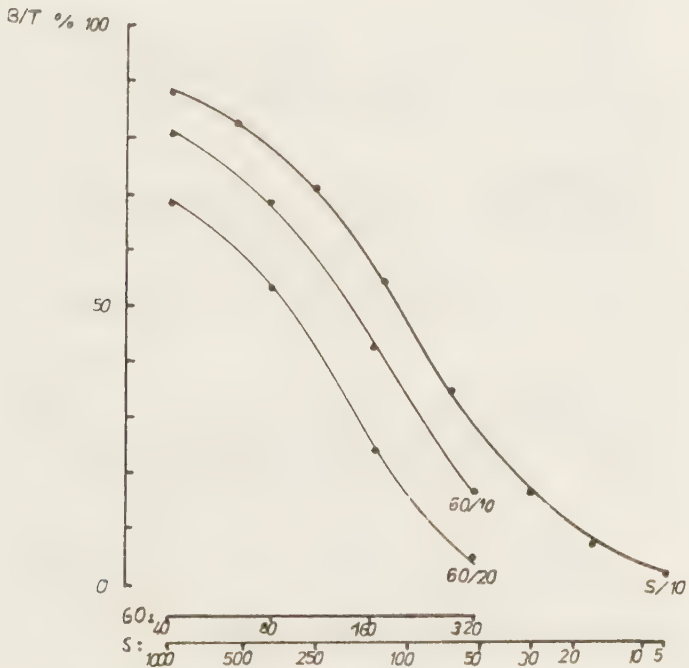


Abb. 12: Serumverdünnungskurven bei erhöhtem Tg-Antikörperspiegel mit und ohne Vorinkubation mit nicht markiertem Antigen

Ordinate: % Tracerbindung

Abszisse: Serumverdünnung

60/10=Serum Nr. 60 bei 10ng Tg

60/20=Serum Nr. 60 bei 20ng Tg

S/10:Standard bei 10ng Tg

Abszissen sind im logarithmischen Maßstab

60: reziproker Verdünnungstiter

S : ng Tg-Antikörper/Ansatz

3.2.4. Qualitätskontrolle des Radioimmunoassay

Präzision

Die Präzision des RIA wird anhand eines Referenzserums überprüft.

Der Variationskoeffizient errechnet sich aus wiederholten Messungen an verschiedenen Tagen zu 8%, innerhalb einer Testreihe zu 3%.

Richtigkeit

Die Richtigkeit der radioimmunologischen Bestimmungen wird anhand der Wiederfindung bekannter zugegebener Mengen Standardantikörperprotein zu antikörper-positiven Referenzen nachgewiesen. Sie beträgt $100\% \pm 3\%$.

Ein weiteres Kriterium für die Richtigkeit einer quantitativen Tg-Antikörperbestimmung ergibt sich aus dem Verlauf von Serumverdünnungskurven.

Zu diesem Zweck werden zwei Patientenseren, die zunächst im screening-Test als Tg-Antikörper-positiv identifiziert wurden, in stärkeren Verdünnungen erneut im RIA gemessen.

Abb. 13 zeigt einen parallelen Verlauf der beiden im halblogarithmischen Maßstab aufgetragenen Serumverdünnungskurven, die zudem noch zu der Standardverdünnungskurve im quantitativen Meßbereich parallel liegen.

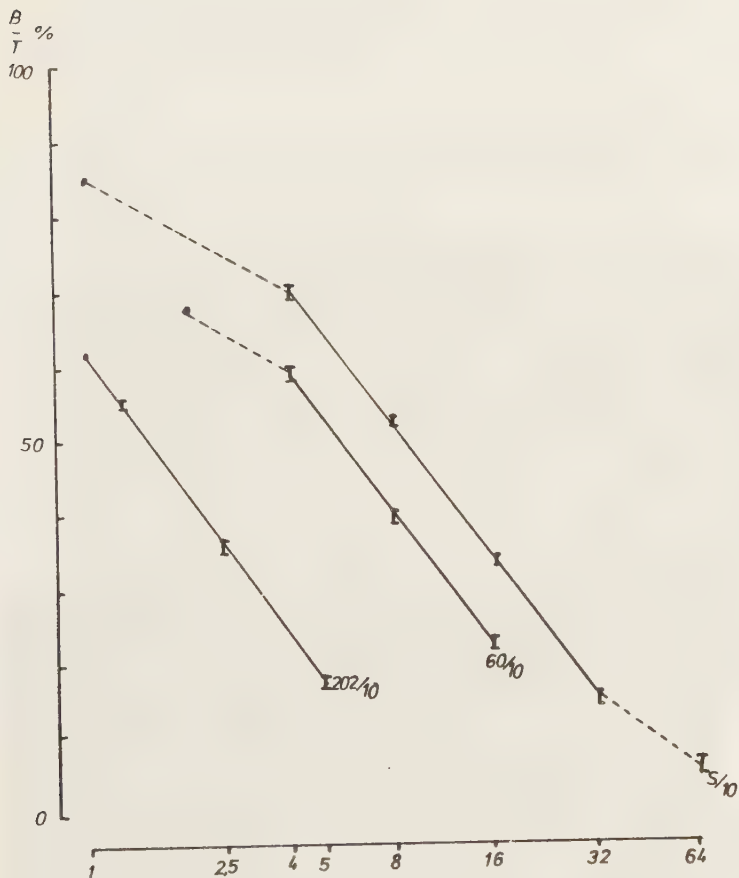


Abb. 13: Serumverdünnungskurven von Tg-Antikörper
enthaltenden Referenzseren

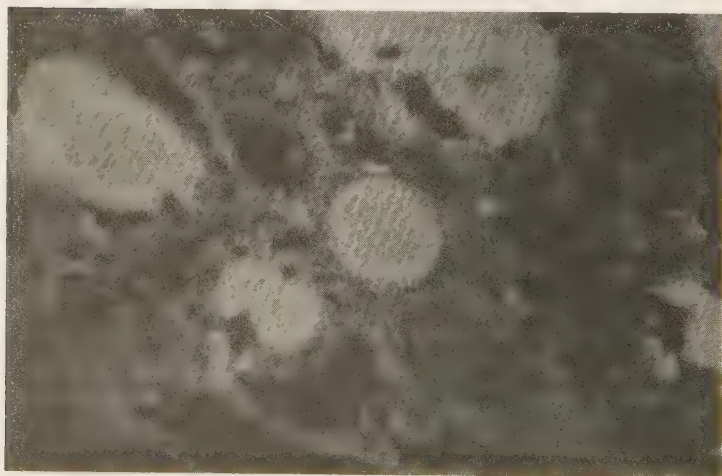
Ordinate: spezifische Bindung %

Abszisse: Reziproke Verdünnungstiter
bezogen auf 1ul Serumprobe,
die Seren sind im Vergleich
zum Standard 1:20 verdünnt.

3.3. Ergebnisse aus Immunfluoreszenzuntersuchungen

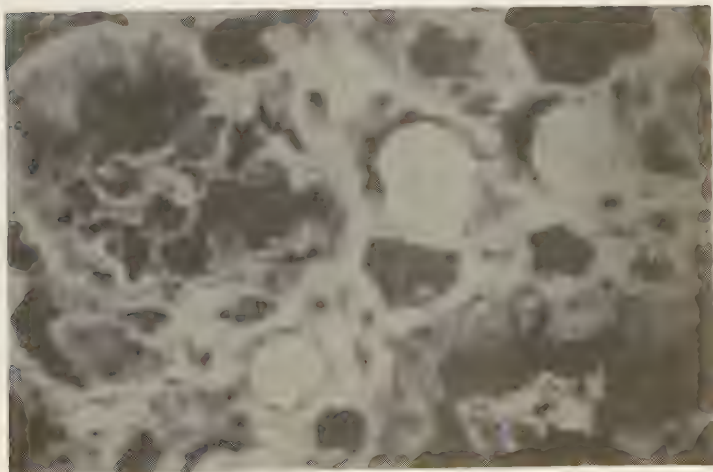
370 Seren von Patienten mit und ohne Schilddrüsenerkrankungen werden im Laufe eines Jahres gesammelt und bei -20°C gefroren aufbewahrt. Alle Seren wurden im Immunbiologischen Labor der Klinik auf Antikörper gegen Mikrosomen (M) und Thyroglobulin (Tg) immun-histologisch untersucht.

Abb. 14 zeigt einen typischen Befund eines Tg-Antikörper-positiven Serums unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem wolkigen Fluoreszenzmuster im Bereich des Kolloids der Follikel.



Hiervon abzugrenzen sind die immun-histologischen Fluoreszenzmuster von schwach Tg-positiven Seren und Tg-negativen Seren.

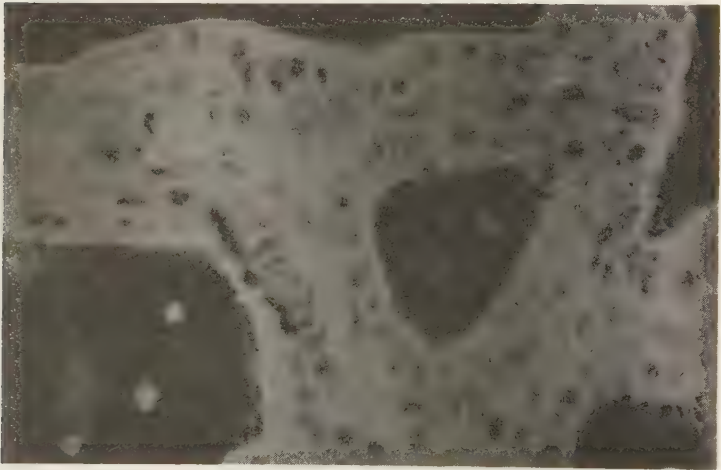
Abb. 15 gibt das fluoreszenzmikroskopische Bild wieder, das sich dem Betrachter bei schwach positiven Seren bietet.



Den Tg-negativen Befund gibt Abb. 16 wieder.



Mikrosomale Antikörper lassen sich an unfixierten Kryostatschnitten von hyperthyreoten Schilddrüsen gut nachweisen, wobei es zu einer Fluoreszenz des Zytoplasmas der Thyreozyten kommt (s. Abb. 17).



Den immun-histologisch negativen Befund auf mikrosomale Antikörper zeigt Abb. 18.



Da alle Seren auf beide Antikörper untersucht werden, lassen sich die Seren entsprechend den immun-histologischen Befunden folgendermaßen einteilen.

Gruppe A: Seren, die Tg-Antikörper enthalten,
nicht aber M-Antikörper (N = 72)

Gruppe B: Seren, die Tg- und M-Antikörper enthalten (N = 136)

Gruppe C: Seren, die M-Antikörper enthalten,
nicht aber Tg-Antikörper (N = 30)

Gruppe D: Seren, die weder Tg- noch M-Antikörper enthalten (N = 132)

In Gruppe A sind 17, in Gruppe B 23 Seren eingeordnet, die immun-histologisch schwach positiven, fraglich negativen Befund zeigen. Diese werden für die radioimmunologische Untersuchung in einer eigenen Gruppe E (N = 40) zusammengefaßt und getrennt untersucht (s. 3.4.).

3.4. Vergleich der Ergebnisse aus RIA- und IIF- Bestimmungen

Die in 3.3. zu Gruppen geordneten 370 Patientenserumproben werden mit dem in 2.2.4. beschriebenen radioimmunologischen Testansatz unter Verwendung einer einheitlichen Antigenkonzentration von 10 ng $^{125}\text{J-Tg}$ /ul Serumprobe gemessen. Dies geschieht, um möglichst viele Seren mit erhöhten Tg-Antikörperkonzentrationen quantitativ bestimmen zu können, andererseits jedoch auch den Normalbereich im unteren Meßbereich des RIA zu erfassen.

Die Ergebnisse aus dem RIA sollen dazu dienen, den Anteil an falsch positiven Meßergebnissen nach der Methode der Indirekten Immunfluoreszenz sowie deren Sensitivität zu überprüfen.



Abb. 19: RIA-Tg-Antikörperbestimmung von IIF Tg-Ak-positiven, M-Ak-negativen Seren der Gruppe A (N = 55)

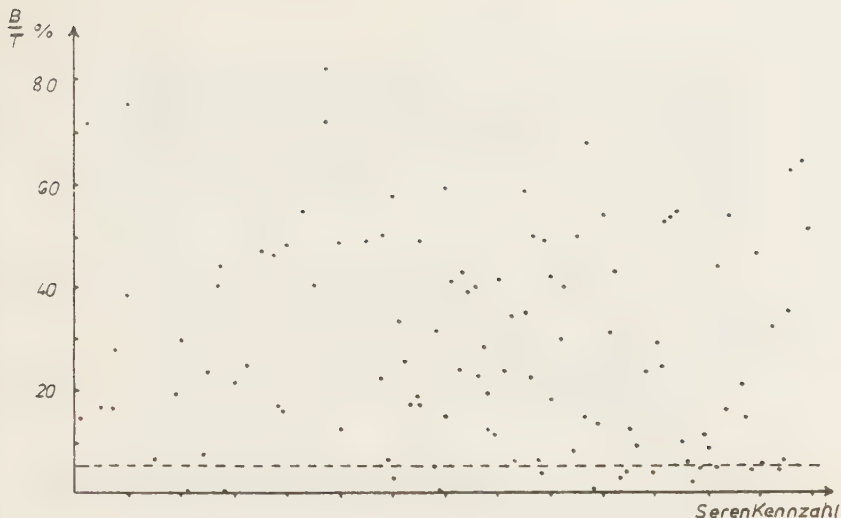


Abb. 20: RIA-Tg-Antikörperbestimmung von IIF-Tg-Ak-positiven und M-Ak-positiven Seren der Gruppe B (N = 113)

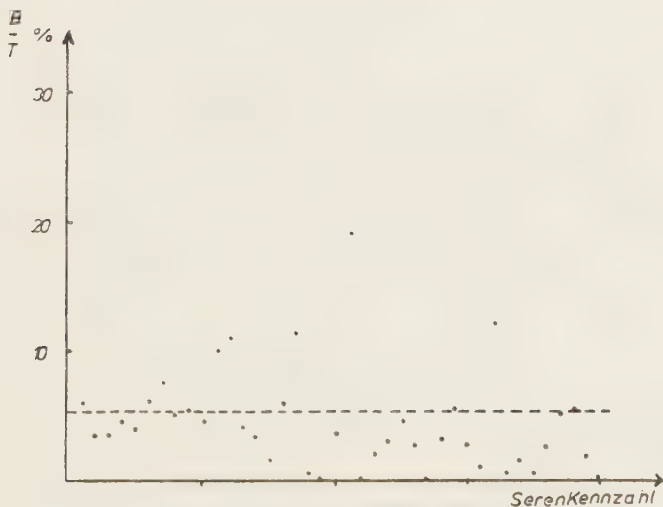


Abb. 21: RIA-Tg-Antikörperbestimmungen von in der IIF schwach Tg-Ak-positiven, fraglich Tg-Ak-negativen Seren aus Gruppe A und B. (N = 40) Gruppe E

Die Abbildungen 19 - 23 verdeutlichen die Vorteile einer kontinuierlich messenden Tg-Bestimmungsmethode - wie dem RIA - gegenüber dem qualitativen Nachweis mit der Indirekten Immunfluoreszenz.

So zeigen die Abb. 19 und 20 außer einer guten Übereinstimmung der beiden Methoden im qualitativen Ergebnis, die große Streubreite der Tg-Antikörperspiegel in den Seren mit positivem immun-histologischen Befund.

Aus den Abb. 19 - 21 folgt, daß die IIF eine empfindliche Nachweismethode für Tg-Antikörper ist. Wenngleich sie dort ihre Grenzen hat, wo es darum geht, eine semiquantitative Aussage über den Tg-Ak-Gehalt zu machen, wie z.B. bei einer Differenzierung zwischen positiven und schwach positiven Seren. Dabei wirkt sich offensichtlich aus, daß die IIF zwar in der Lage ist, Tg-Antikörper auch im radioimmunologisch bestimmten Normbereich festzustellen, ohne daß jedoch eine strenge Korrelation zwischen den immun-histologischen Bildern (s. Abb. 15 - 16), aus denen die negativen und schwach positiven Befunde resultieren, und den tatsächlich mit dem RIA gemessenen Tg-Ak-Spiegeln besteht.

Die Abb. 22 und 23 stellen die Gegenprobe für den Vergleich der beiden Nachweismethoden im unteren Kontrollbereich (zwischen 0-5% spezifischer Bindung) dar.

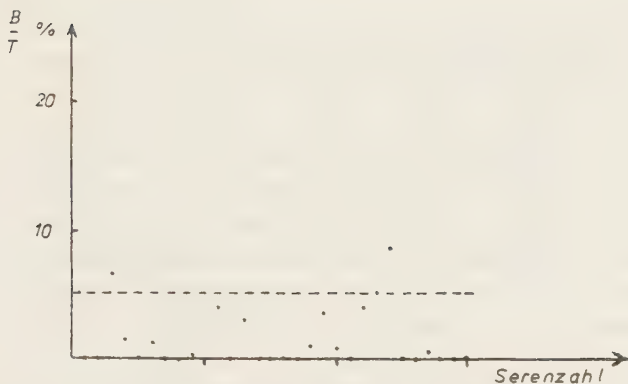


Abb. 22: RIA-Tg-Antikörperbestimmungen von in der IIF Tg-Ak-negativen, M-Ak-positiven Seren der Gruppe C (n=30)

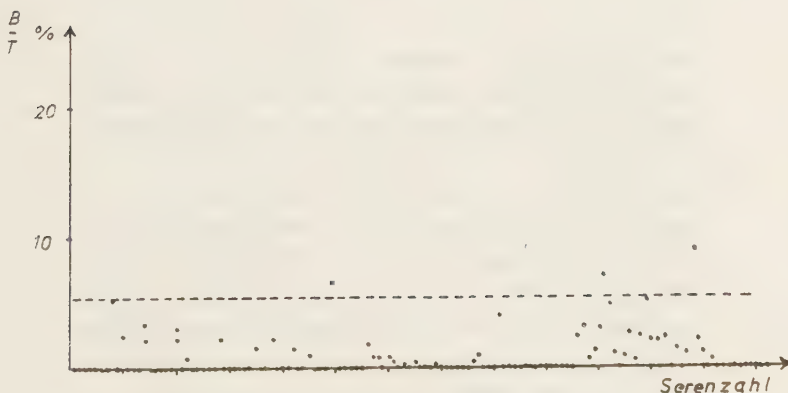


Abb. 23: RIA-Tg-Antikörperbestimmungen von in der IIF Tg-Ak-negativen und M-Ak-negativen Seren der Gruppe D (N = 132)

Die unterbrochenen Linien in den Abb. 19 - 23 geben den Grenzwert von 5% spezifischer Bindung im RIA an.

Einen direkten Vergleich der Ergebnisse beider Methoden hinsichtlich Divergenzen oder Übereinstimmungen ermöglicht Tabelle 2 auf S. 47.

Eine gute Übereinstimmung zwischen RIA und IIF besteht bei den Seren, die immun-histologisch Tg-Ak-negative Befunde aufweisen. Lediglich zwei Seren in Gruppe C (N=30) und vier Seren in Gruppe D (N=132) ergeben im RIA eine spezifische Bindung zwischen 5-10%.

Weitgehende Übereinstimmung im qualitativen Ergebnis beider Methoden besteht bei den IIF-Tg-Ak-positiven Seren.

16,5% aus der Gruppe A (N=55) und 13.3% aus der Gruppe B dieser Seren weisen im RIA keinen bzw. keinen über den Normbereich hinausgehenden Tg-Ak-Spiegel auf.

Eine deutliche Diskrepanz ist bei den IIF-Tg-Ak-schwach-positiven Seren hinsichtlich der vergleichbaren Ergebnisse aus IIF und RIA festzustellen.

Die Gruppe E enthält den RIA-Messungen zufolge lediglich ein Drittel (35%) positiver Seren mit einer spezifischen Bindung zwischen 5-20%. Die restlichen Seren enthalten Tg-Antikörper im Normbereich und sollten, gemäß dem immun-histologischen Bild der Abb. 15 auf S. 39 als fraglich positiv angesehen werden.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Ergebnisse von RIA- und IIF- Tg-Ak-Bestimmungen.

Ergebnisse	Indirekte - Immun - Fluoreszenz (IIF)				
	negativ		schwach positiv		positiv
	Gruppe D (%) N=132	Gruppe C (%) N=30	Gruppe E (%) N=40	Gruppe B (%) N=113	Gruppe A (%) N=55
(RIA)					
B/T %					
negativ	128 (97)	28 (93)	26 (65)	15 (13.3)	9 (16.5)
(Normbereich)					
5-20	4 (3)	2 (7)	14 (35)	33 (29.2)	19 (34.5)
positiv					
20-60				58 (51.3)	22 (40.0)
>60				7 (6.2)	5 (9.0)

Erläuterungen zu den Gruppen A - E siehe Legenden zu den Abb. 19 - 23

% B/T: RIA-Messbereich spezifischer Bindung.

3.5. Klinische Ergebnisse

Normalbereich

Zur Bestimmung des Normalbereichs werden 82 Seren von gesunden Probanden und Patienten, die keinen klinischen Schilddrüsenbefund aufweisen und nach immun-histologischen Untersuchungen Tg-Antikörper negativ sind, im RIA gemessen.

Es ergibt sich ein Mittelwert von $3.5 \pm 1.5\%$ spezifischer Bindung. Daraus berechnet sich ein Normalbereich von 7.5 ± 2.5 ng Tg-Ak-Protein/ul Serumprobe. ($\bar{x} \pm s$)

17% der Seren ergeben eine spezifische Fällungsrate $\geq 5\%$ ($6.8 \pm 1.5\%$ entsprechend 16 ± 4 ng Tg-Ak-Protein/ul Serumprobe) ($\bar{x} \pm s$)

Diese Ergebnisse korrelieren gut mit denen anderer Autoren. Pinchera et al. (52) gibt einen Normalbereich von 20-300 E/ml entsprechend 0.6 - 9 ug/ml bei einer Nachweisgrenze für Tg-Antikörper von 30 - 60 ng, gemessen mit 'solid-state-RIA'. Bodlaender et al. (7) bestimmte bei 70% einer gesunden Kontrollgruppe eine spezifische Fällungsrate von 4% (Co-Präzipitations-screening-Methode).

Tg-Antikörperspiegel bei Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen

Um die klinische Relevanz serologischer Tg-Ak-Bestimmungen bei Patienten mit Hyperthyreose, primärer Hypothyreose, Morbus Basedow und Immunthyreoiditis zu überprüfen, sind die klinischen Diagnosen zu 252 Patientenseren im Archiv für

Krankengeschichten der Medizinischen Klinik Innenstadt ausfindig gemacht worden. Es ist dabei allerdings ausdrücklich darauf verzichtet worden, Korrelationen zwischen Krankheitsbild, -schweregrad und -verlauf und dem quantitativen Ergebnis der RIA-Untersuchung aufzudecken. Außerdem wurde kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Patienten gemacht.

Da es sich zudem um eine retrospektive Ermittlung von klinischen Diagnosen von Patienten handelt, die bei Serumabnahme in ambulanter bzw. stationärer Behandlung der Klinik standen bzw. zu Kontrolluntersuchungen einbestellt wurden, differieren zum Teil Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Serumabnahme.

In den Abb. 24 - 27 sind die Meßergebnisse, die mit dem RIA gemessen wurden, von 149 immunhistologisch Tg-Ak-positiven Seren in Ergänzung zu Kapitel 3.4. dargestellt.

In Tabelle 3 auf Seite 55 sind die Tg-Ak-Spiegel aller 252 Patientenserum in Einheiten/ml berechnet zusammengestellt.

Tg-Antikörperbestimmungen aus Patientenserum mit
der klinischen Diagnose

Primäre Hypothyreose (RIA)

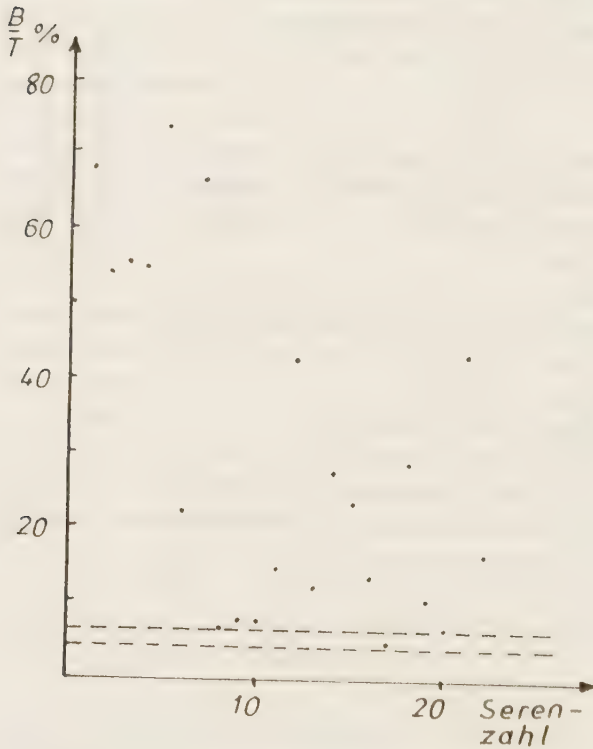


Abb. 24: Tg-Antikörperspiegel bei primärer
Hypothyreose (N = 22)

Ordinate: % spezifische Bindung

Abszisse: Anzahl der immun-histologisch
Tg-Ak-positiven Seren

-----: Oberer Normbereich

Tg-Antikörperbestimmungen aus Patientenseren
mit der klinischen Diagnose antikörperpositive

Hyperthyreose (RIA)

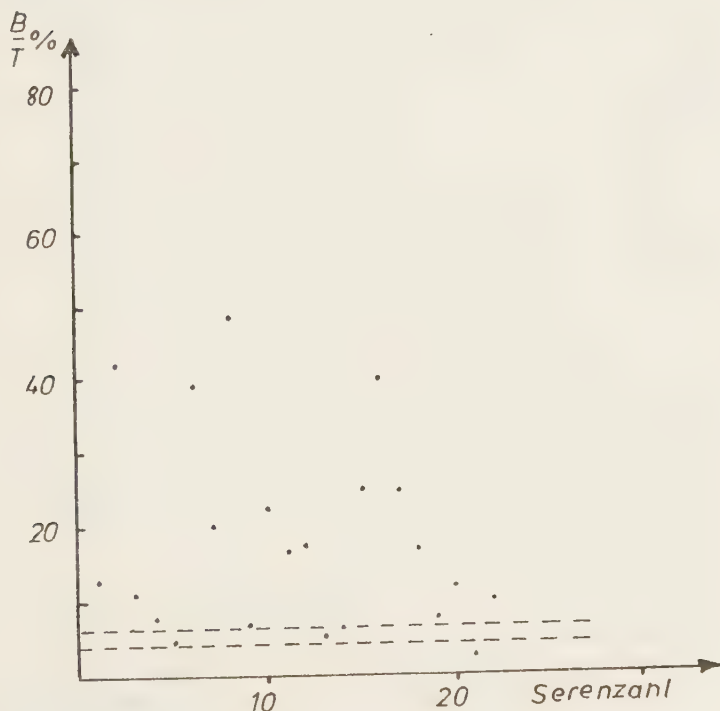


Abb. 25: Tg-Antikörperspiegel bei Hyperthyreose
(ohne M. Basedow bzw. Klinik einer
Immunthyreoiditis) (N = 22)
Ordinate: %spezifische Bindung
Abszisse: Anzahl der immun-histologisch
Tg-Ak-positiven Seren
-----: Oberer Normbereich

Tg-Antikörperbestimmungen aus Patientenseren
mit der klinischen Diagnose

Morbus Basedow (RIA)

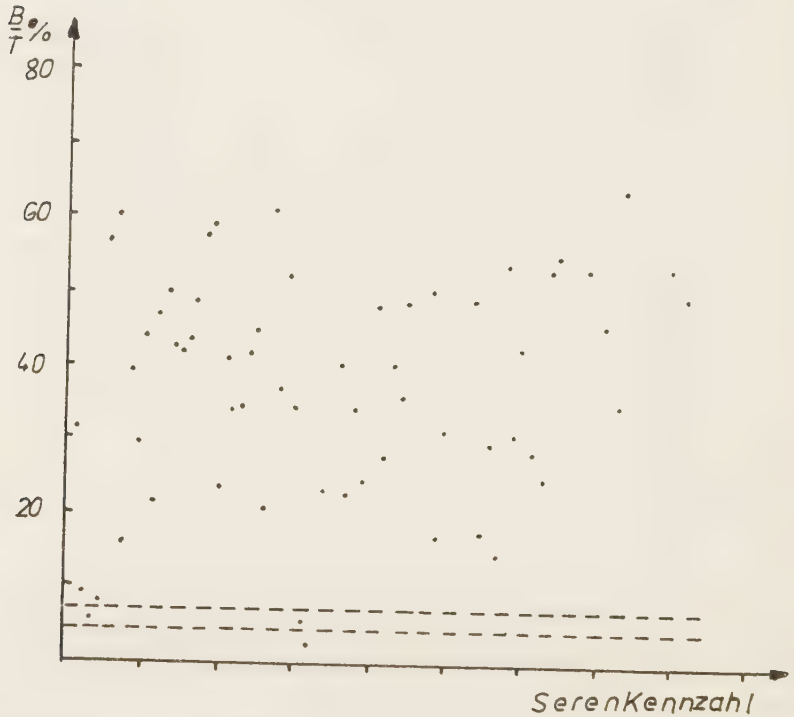


Abb. 26: Tg-Antikörperspiegel bei
Morbus Basedow

Ordinate: % spezifische Bindung

Abszisse: Serenkennzahl (N = 62) der
immun-histologisch Tg-Ak-
positiven Seren

-----: Oberer Normbereich

Tg-Antikörperbestimmungen aus Patientenserum
mit der klinischen Diagnose

Immunthyreoiditis (RIA)

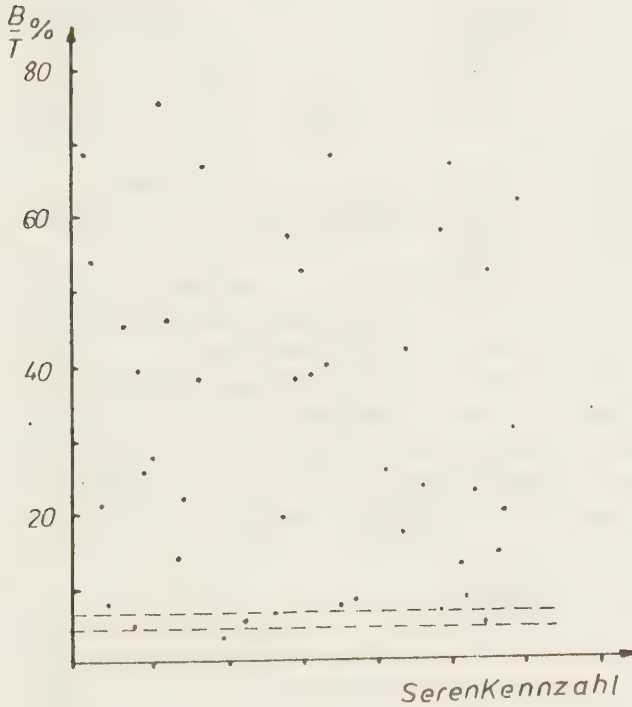


Abb. 27: Tg-Antikörperspiegel bei Immunthyreoiditis

Ordinate: % spezifische Bindung

Abszisse: Serumkennzahl (N = 43)

der immun-histologisch Tg-Ak-
positiven Seren

-----: Oberer Normbereich

In den Abbildungen 24 - 27 sind die radioimmunologische Meßergebnisse der immun-histologisch Tg-Ak-positiven Seren (N = 149) dargestellt.

In der folgenden Tabelle 3 sind die RIA-Meßergebnisse aller getesteten Seren von Patienten (N = 252) tabellarisch erfaßt, die ihren Krankengeschichten zufolge zu einer der vier klinischen Diagnosen:

Primäre Hypothyreose, Hyperthyreose, Morbus Basedow oder Immunthyreoiditis zugeordnet werden konnten.

Die Serenzahl entspricht der Zahl der Fälle. Von Mehrfachbestimmungen sind jeweils nur ein Meßwert in der Tabelle 3 angegeben.

Die Umrechnung der % spezifischer Fällung (B/T) in E/ml erfolgt nach Ablesen der gefällten Tg-Ak-menge aus der Kalibrierstandardkurve (s. Abb. 12), wobei 1 Einheit dem Äquivalent der spezifischen Fällung von 30 ng des Standard-Tg-Ak-proteins entspricht.

Tabelle 3: RIA-Tg-Antikörperbestimmungen bei verschiedenen Diagnosen

Klinische Diagnosen	Anzahl Fälle	Normbereich		Pathologischer Bereich										RIA RIA	
		N	%	0.3-1 ME/ml	N	%	1 - 3 ME/ml	N	%	3 - 6 ME/ml	N	%	>10 ME/ml	N	%
Primäre Hypothyreose	30	8	26.5	7	23.3	8	26.5	3	10	4	13.7	22	74		
Hyperthyreose	62	36	58	13	21	12	19.4	1	1.6	-	-	26	42		
Morbus Basedow	100	30	30	13	13	35	35	22	23	-	-	70	70		
Immunthyreoiditis	60	12	20	15	25	20	33.3	8	13.3	5	8.3	48	80		

1 ME = 1 Mega-Einheit = 1000 Einheiten

1 E = Äquivalent zu 30 ng des Standards

Die Umrechnung von % B/T in E/ml ergibt sich aus der Kalibrierstandardskurve

4. Diskussion

4.1. Methodik

Bei dem beschriebenen Radioimmunoassay für die Bestimmung von Tg-Autoantikörpern nach der Doppelantikörper-Methode handelt es sich nicht um einen RIA mit kompetitiver Hemmung, sondern um eine Art Bindungsanalyse.

Die Anti-Tg-Immunglobuline der Gruppen IgA IgM, IgG (13, 66) in den zu untersuchenden Patientenseren und den parallel mitbestimmten Standardproteinlösungen werden mit einem mäßigen Überschuß an ^{125}Jod -markiertem Thyreoglobulin abgesättigt (10-20 ng $^{125}\text{J-Tg/ul}$ Serumprobe). Dieser Überschuß berücksichtigt die endogenen Serum-Tg-Spiegelschwankungen, wie sie von den Autoren van Herle et al. (28), Pezzino et al. (50) und Schneider et al. (62) beschrieben wurden. Eine zusätzliche Erhöhung der Antigenkonzentration, z.B. durch Zusatz von nicht markiertem 'kaltem' Thyreoglobulin, wie er von Pinchera et al. (52) verwendet wird, bewirkt einen dosisabhängigen inhibierenden Effekt (siehe Abb. 10 und 12). Dieser kann im vorliegenden RIA bei der quantitativen Tg-Ak-Bestimmungsmethode genutzt werden, wenn es darum geht, Verdünnungen von mehr als 1:100 von Seren mit erhöhten Tg-Ak-Spiegeln zu vermeiden. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die Nachweisgrenze des Assays, die unter den in Kap. 3.2.3. beschriebenen Standardbedingungen bei 3- 7 ng/ul Serumprobe liegt, so stark verringert werden kann, daß der Normbereich, der bei $7,5 \pm 2,5$ ng/ml Serumprobe liegt (s. Kap. 3.5.) nicht gleichzeitig mitbestimmt wird.

Die Praxis der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, daß die Konstanzhaltung der Reaktionsbedingungen wichtig ist.

Der Antigen-Antikörper-Immunkomplex wird mit einem Überschuß an Anti-Human-Immunglobulin (Ig-Fraktion) ausgefällt. Hierbei werden auch lösliche Immunkomplexe erfaßt, was bei anderen Methoden wie der Solid-Phase-Technik (3,39) und dem kompetitiven Bindungsassay (44,45) nicht gewährleistet ist.

Die Radioaktivität des Niederschlags ist ein Maß für den Tg-Antikörpergehalt der Serumprobe.

Die größte Empfindlichkeit der quantitativen Immunpräzipitation herrscht im steilsten Bereich der Kalibrierstandardkurve zwischen 15-60% spezifischer Fällung.

Meßergebnisse oberhalb dieses Bereichs erfordern eine größere Verdünnung der Serumprobe als im screening-Test mit 1 ul/Ansatz angegeben (s. Kap. 3.2.2.). In der Regel reichen Verdünnungen bis zu 1:200 aus. Die Präzision beträgt unter Standardbedingungen 5-8% im Interassay und 1-3% im Intraassay.

4.2. Klinik

Seit über zwei Jahrzehnten stellt sich die Frage nach der klinischen Bedeutung zirkulierender Antikörper bei Schilddrüsenerkrankungen (16, 22). Im Mittelpunkt des Interesses stehen die Mikrosomen- und die Thyreoglobulin-Antikörper, da sie für die Diagnostik der Autoimmunschilddrüsenerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (29, 30, 57). Da Thyreoglobulin-Antikörper wie auch mikrosomale Antikörper bei nicht-immunologischen Schilddrüsenerkrankungen und auch bei Gesunden beschrieben worden sind, könnte für die Diagnosestellung durch den Kliniker vor allem die Höhe der Antikörperspiegel von Bedeutung sein.

Mit dem vorliegenden Radioimmunoassay sind 252 Serien von Schilddrüsen-Patienten mit vier typischen Krankheitsbildern wie der primären Hypothyreose, der Hyperthyreose, des Morbus Basedow und der Auto-Immunthyreoiditis auf die Tg-Antikörperspiegel untersucht (s. Kap. 3.5.) und mit den serologischen Befunden der Indirekten Immunfluoreszenz verglichen worden.

Obwohl beim Morbus Basedow die Antikörper gegen Mikrosomen überwiegen (41, 45), haben RIA-Messungen gezeigt, daß in 70% der Fälle der untersuchten Patienten mit Morbus Basedow auch Tg-Antikörper nachweisbar sind. Die Tg-Ak-Spiegel erreichen jedoch im statistischen Mittel nicht die Höhe, wie sie bei der primären Hypothyreose oder den Auto-Immunthyreoiditiden - Struma lymphomatosa Hashimoto und atrophische Verlaufsform - vorkommen (S. Tab. 3).

Die Inzidenz für Tg-Antikörper in Seren von Patienten mit primärer Hypothyreose liegt bei 70%, bei den Formen der Immunthyreoiditis bei 80%. Niedrige Antikörper-Titer schließen eine Autoimmunthyreoiditis, wie Abb. 24 - 27 zeigen, nicht aus.

Ein Vergleich der Ergebnisse aus RIA und IIF weist wegen der quantitativen Meßbreite auf eine größere Aussagekraft von radioimmunologischen Tg-Antikörperbestimmungen hin (s. Tab. 2). Die IIF bietet jedoch die Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung von Tg- und M-Antikörpern.

Dies ist besonders in der Differentialdiagnose zwischen Morbus Basedow und multiplem autonomen Adenom nützlich, vor allem dann, wenn vor Ausbruch der Hyperthyreose schon eine Knotenstruma bestand und eine pathognomonische endokrine Ophthalmopathie nicht vorliegt (34).

Zur Diagnose der euthyreoten endokrinen Ophthalmopathie ist die Tg-Autoantikörper-Untersuchung ebenfalls hilfreich (23). Nach Ausschluß eines retrobulbären Tumors stellt der Nachweis von Tg-Antikörpern ein Kriterium für die Diagnose einer endokrinen Ophthalmopathie (34) dar.

Für die Thyreoglobulinantikörper ist zur Zeit keine pathogenetische Rolle gesichert. Eine Reihe von Untersuchungen, die Thyreoglobulin-Antithyreoglobulin-Komplexe bei der Autoimmun-Thyreoiditis vom Typ Hashimoto und beim Morbus Basedow nachweisen, legen jedoch den Schluß nahe, daß diese Komplexe über einen zellvermittelten autoimmunologischen Prozeß Killer-Zellen aktivieren, die ihrerseits die das Thyreoglobulin enthaltenden Thyreozyten

der Schilddrüse schädigen (9, 64). Bei der Pathogenese der endokrinen Ophthalmopathie wird kontrovers diskutiert, ob zirkulierende Thyreoglobulin-Antithyreoglobulin-Immunkomplexe an die extraokularen Muskelmembranen gebunden werden, was Immunprozesse zur Folge haben könnte (34). Ein weiterer Aspekt für die quantitative radioimmunologische Bestimmung für Thyreoglobulin-Autoantikörper ergibt sich schließlich aus einer Reihe von Befunden, die das Vorkommen zirkulierender Thyreoglobulin-Antithyreoglobulin-Immunkomplexe im Zusammenhang mit Schilddrüsenerkrankungen und rheumatischen Arthritiden (5) sowie Glomerulonephritiden (25, 31, 51, 71) beschreiben.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß bei der retrospektiven Durchsicht der Krankengeschichten der Patienten mit Verdacht auf Autoimmunthyreoiditis nicht selten auch andere endokrine Erkrankungen eine Rolle spielten, wie die perniciöse Anämie, der insulinpflichtige Diabetes mellitus, der Morbus Addison (idiopathische Form) sowie das Sjörgen Syndrom, ohne daß aber im Rahmen dieser Arbeit auf eine möglicherweise differenzierende Bewertung des RIA auf die Polyendokrinopathie eingegangen wurde.

5. Zusammenfassung

Schilddrüsenautoantikörper und insbesondere Thyreoglobulinantikörper lassen sich mit radioimmunologischen Bestimmungsmethoden, der Doppelantikörpermethode (49, 59), dem kompetitiven Radiobindungsassay (44, 45) und der Solid-phase Technik (3, 39) gut nachweisen. Hinsichtlich Sensibilität und Quantifizierbarkeit der Meßergebnisse sind diese Radioimmunoassays anderen in der Klinik verwandten Nachweismethoden für Thyreoglobulinantikörper überlegen (1, 58, 67).

In der vorliegenden Arbeit ist ein empfindlicher Radioimmunoassay als Doppelantikörpermethode ausgearbeitet worden, wobei ^{125}J -Thyreoglobulin - Thyreoglobulin-antikörper - Immunkomplexe mit Anti-Human-Immunglobulin präzipitiert werden.

Die Meßergebnisse aus dem Radioimmunoassay zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immun-histologischen Befundung.

Im Gegensatz zur immun-histologischen Bestimmung kann mit dem beschriebenen Radioimmunoassay die Höhe der Tg-Antikörperspiegel in den einzelnen Gruppen von Seren quantitativ erfaßt werden. Besonders häufig traten hohe bis sehr hohe Tg-Antikörperspiegel in den untersuchten Seren von Patienten mit Autoimmun-Thyreoiditis (80%), primärer Hypothyreose (74%) und Morbus Basedow (70%) auf.

Die Inzidenz bei gesunden Probanden und Patienten ohne klinischen Schilddrüsenbefund betrug im RIA in der Regel weniger als 5% spezifischer Bindung.

Ergebnisse und Methodik sind gut mit den Angaben anderer Autoren vergleichbar (7, 49, 52), wenn- gleich die vorgestellte Doppelantikörpermethode bezüglich Testansatz und Auswertungsverfahren Vorteile mit sich bringt.

Literaturverzeichnis

- (1) Amino, N., Kuro, R., Tanzizawa, O., et al.:
Changes of serum anti-thyroid antibodies
during and after pregnancy in autoimmune
thyroid diseases Clin. exp. Immunol. 31:
30-37, 1978
- (2) Anderson, James W., McConahey, William M.,
Alarcón-Segovia, Donato, et al.:
Diagnostic Value of Thyroid Antibodies
J. Clin. Endocr. 27: 937-944, 1967
- (3) Bayer, Monika F., Kriss, Joseph P.:
A Solid Phase, Sandwich-Type Radioimmuno-
assay for Antithyroglobulin: Elimination
of False Positive Results and Semiquanti-
tative Measurement of Antithyroglobulin
in the Presence of Elevated Thyroglobulin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49: 565-571, 1979
- (4) Berzofsky, J.A.:
The Assessment of Antibody Affinity from
Radioimmunoassay
Clin. Chemistry 24, 3: 419-421, 1978
- (5) Blake, D.R., Mc Gregor, A.M., Stansfield, E.,
Rees-Smith, B.:
Antithyroid-Antibody-activity in the
synovial fluid of patients with various
arthritisides Lancet 2, 8136: 224-226, 1979
- (6) Brohee, D., Delespasse, G., Debisschop, M.J. &
Bonnyns, M.:
Circulating immune complexes in various
thyroid diseases
Clin. exp. Immunol. 36: 379-383, 1979

- (7) Bodlaender, P., Arjonilla, J.R., Twomey, S.L.:
Sensitive Radioimmunological Screening Test
For Anti-Thyroglobulin Autoantibodies
Clin. Chem. 24/2: 272-274, 1978
- A Practical Radioimmunoassay of Thyro-
globulin
Clin. Chem. 24:2: 267-271, 1978
- (8) Boyden, S.V.:
The adsorption of proteins on Erythrocytes
treated with tannic acid and subsequent
hemagglutination by antiprotein sera
J. Exp. Med. 93: 107-113, 1951
- (9) Calder, E.A., Irvine, W.J., McLeman, D.,
Lymphocyte Cytotoxicity Induced by Pre-
incubation With Serum From Patients With
Hashimoto Thyroiditis
Clin. Exp. Immunol. 15: 467-470, 1973
- (10) Cooper, T.G.:
Biochemische Arbeitsmethoden
Übersetzt von Neumeier, R., Maurer, H.R.
de Gruyter Verlag - 1981
- (11) Cuatrecasas, Pedro:
Protein Purification by Affinity Chromato-
graphy Derivatizations of Agarose and
Polyacrylamide Beads
The Journal of Biological Chemistry,
Vol. 245, No. 12, Issue of June 25,
pp. 3059-3065, 1970

- (12) Davoli, C., Salabé, G.B. & Andreoli, M.:
Immunoreactive properties of anti-thyroglobulin autoantibodies isolated by affinity chromatography from human thyroiditis serum
Clin. exp. Immunol. 31: 218-225, 1978
- (13) Delespesse, G., Hubert, C., Gausset, Ph.
& Govaerts: A Radioimmunoassay for human antithyroglobulin antibodies of different immunoglobulin classes Hormone Metab. Res. 8: 50, 1976
- (14) Derrien, Y., Michel, R., Roche, J.:
Recherches sur la preparation et les propriétés de la thyreoglobuline pure
Biochem. biophys. Acta 2: 454, 1948
- (15) Doniach, D., Roitt, J.M.:
Thyroid auto-allergic disease in:
Clinical Aspects of Immunology
Eds.: Gell and Coombs
Blackwell Scientific Publications
pp: 933-958, 1968
- (16) Drexhage, H.A., Botazzo, G.F., Doniach, D.:
Evidence For Thyroid-Growth-Stimulating Immunoglobulins In Some Goitrous Thyroid Diseases
The Lancet, August 9: 287-292, 1980
- (17) Dunn, J.T. and Ray, S.C.:
Variations in the Structure of Thyroglobulin from Normal and Goitrous Human Thyroids
J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 47 No. 4: 861-869, 1978

- (18) Eggo, M.C., Burrow, G.W., Alexander, J.H. and Gordon, J.H.:
Iodination and the Structure of Human Thyroglobulin
J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 51 No. 1:
7-11, 1980
- (19) Endo, K., Kasagi, K., Konishi, J. et al.:
Detection and properties of TSH-binding inhibitor immunoglobulins in patients with Graves disease and Hashimoto's thyroiditis
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46/5: 734-739
1978
- (20) Farr, R.S.:
A quantitative immunochemical measure of primary interaction between J^X -BSA and antibody
J. Infect. Dis. 103: 239, 1958
- (21) Feldt-Rasmussen, U.:
Purification Of Human Thyroglobulin For Radioimmunoassay And Testing By Ultracentrifugal Analysis And Immunoelectrophoresis
J. Immunolog. Methods, 21: 295-303, 1978
- (22) Feld-Rasmussen, U., Husby, S., Blabjerg, O. et al.:
In vitro characterization of synthesized thyroglobulin immune complexes (IC).
A model for studies of IC containing an Autoantigen
Allergy 36/2: 107-113, 1981

- (23) Feld-Rasmussen, U., Kemp, A., Bech, K. et al.:
Serum thyroglobulin, its autoantibody and
thyroid stimulating antibodies in the
endocrine exophthalmus
Acta Endocrinol. (Copenhagen) 96/2:
192-198, 1981
- (24) Fulthorpe, A.J., Roitt, I.M., Doniach, D.,
Couchman, K.:
A stable sheep cell preparation for detecting
thyreoglobulin autoantibodies and
its clinical application
J. Clin. Path. 14: 654-662, 1961
- (25) Germuth, F.G., Rodriguez, E., Saeeda, D.,
Siddiqui, Y., Lorelle, C.A., McGee, S.,
Milano, L.L., Wise, O'L.:
Immune Complex Disease
VII. Experimental Mesangiopathic Glomerulonephritis
Produced by Chronic Immunization with Thyroglobulin
Laboratory Investigation, 38/4: 404-408, 1978
- (26) Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.:
The Preparation of ¹³¹J-Labelled Human Growth
Hormone of High Specific Radioactivity
Biochem. J., 89: 114-123, 1963
- (27) Groot, L.J. De, Hoyer, K., Refetoff, S.,
Herle, A.J. Van, Asteris, G.T., Rochman, H.:
Serum Antigens and Antibodies in the Diagnosis
of Thyroid Cancer
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45: 1220-1223,
1977

- (28) Herle, A.J. Van, Uller, R.P., Matthews, N.L.
and Brown, J.:
Radioimmunoassay for Measurement of Thy-
roglobulin in Human Serum
J. Clin. Investigation, 52: 1320-1327,
1973
- (29) Hopf, U., Hutteroth, T.H., Kotulla, P.:
Demonstration of circulating immune com-
plexes in Graves' disease by the Raji
cell technique and their relation to
different thyroid autoantibodies
Horm. Metab. Res., 11/11: 622-628, 1979
- (30) Hopwood, N.J., Rabin, B.S., Foley, T.P.Jr.
and Peake, R.L.:
Thyroid antibodies in children and ado-
lescents with thyroid disorders
J. Pediatr., 93/1: 57-61, 1978
- (31) Horvath, F. jr., Teague, P., Gaffney, E.F.,
Mars, D.R.:
Thyroid antigen associated immun complex
glomerulonephritis in Graves' disease
Am. Journal of Med. 67: 901-4, 1979
- (32) Izumi, M., Larsen, P.R.:
Correlation of Sequential Changes in
Serum Thyroglobulin, Triiodothyronine,
and Thyroxine in Patients with Graves'
Disease and Subacute Thyroiditis
Metabolism, 27/4: 449-460, 1978

- (33) Jordan, S.C., Buckingham, B., Sakai, R.,
Olson, D.:
Studies Of Immune-Complex Glomerulonephritis Mediated By Human Thyroglobulin
The New England Journal Of Medicine,
304/20: 1212-1215, 1981
- (34) Konishi, I., Herman, M., N., Kriss, J.P.:
Binding of Thyroglobulin and Thyroglobulin-Antithyroglobulin Immune Complex
to Extraocular Muscle Membrane
Endocrinology 95: 434-446, 1974
- (35) Kung, V.T., Weber, P.M., Remedios, L.V., dos:
Double-Antibody Radioimmunoassay of Thyroid
Microsomal Antibody in Serum
Clin. Chem. 27/1: 39-42, 1981
- (36) Lamas, L.:
Kinetics of the Iodination and the Coupling
Reaction in Thyroglobulin Catalyzed by
Lactoperoxidase and Chloramine T
Eur. J. Biochem., 96: 93-99, 1979
- (37) Lambery, B.A.:
Aetiology of Hypothyroidism
Clin. Endocrinol. Metab. 8: 3-20, 1979
- (38) Leonard, J.P., Taymans, F., Beckers, C.:
Quantitation Of Human Serum Antithyroglobulin Antibodies By A Two-Site Radioimmunoassay
Clinica Chimica Acta, 87: 1-9, 1978

- (39) Leonard, J.P., Taymans, F., Beckers, C.:
Development Of A 2-Site Radioimmunoassay
For Antithyroglobulin Antibodies Using
 ^{125}J -Thyroglobulin
International Symposium On Radioimmuno-
assay And Related Procedures In Medicine
Berlin (West), 31.10.-4.11.1977
- (40) Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.,
Randall, R.J.:
Protein Measurement with Folin Phenol
Reagent
J. Biolog. Chem., 193: 155, 1951
- (41) Mariotti, S., Pinchera, A., Vitti, P.,
Chiovato, L., Marcocci, C., Urbano, C.,
Tosi, M., Baschieri, L.:
Comparison of radioassay and haemaggluti-
nation methods for anti-thyroid microsomal
antibodies
Clin. exp. Immunol., 34: 118-125, 1978
- (42) Mariotti, S., Grrot, L.J., De, Scarborough,
D., Medof, M.E.:
Study of circulating immune complexes in
thyroid disease: Comparison of Raji cell
radioimmunoassay and specific thyroglo-
bulin-antithyroglobulin radioassay
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49/5: 679-686,
1979
- (43) Maurer, H.R.:
Disc electrophoreses and related techni-
ques of polyarylamid gel electrophoreses
De Gruyter Berlag, Berlin - New York, 1971

- (44) Mori, T., Fisher, J., Kriss, J.P.:

Studies of an in Vitro Binding Reaction
Between Thyroid Microsomes and Long Acting
Thyroid Stimulator Globulin (LATS):

I. Development of Solid-State Competitive
Binding Radioassay Methods for Measurement
of Antimicrosomal and Antithyroglobulin
Antibodies

J. Endocrinol. Metab., 31: 119-133, 1970

- (45) Mori, T., Kriss, J.P.:

Measurements by Competitive Binding Radio-
assay of Serum Anti-Microsomal and Anti-
Thyroglobulin Antibodies in Graves' Disease
and other Thyroid Disorders

J. Clin. Endocr., 33: 688-698, 1971

- (46) Morrison, M., Bayse, G.S., Webster, R.G.:

Use Of Lactoperoxidas Catalyzed Iodination
In Immunochemical Studies

Immunochemistry 8: 289-297, 1971

- (47) Ouchterlony, Ö.:

Diffusion-in-gel method for immunological
analysis

Progr. Allergy 6: 30-154, 1962

- (48) Owen, S.G., Smart, G.A.:

Thyroid Antibodies in Myxoedema

The Lancet, 1034-1037, 1958

- (49) Peake, R.L., Willis, D.B., Asimakis, G.K.Jr.,

Deiss, W.P.:

Radioimmunologic assay for antithyroglo-
bulin antibodies

J. Lab. Clin. Med., 84/6: 909-919, 1974

- (50) Pezzino, V., Cozzani, P., Filetti, S.,
Galbiati, A., Lisi, E., Squatrito, S.,
Vigneri, R.:
A radioimmunoassay for human thyroglobulin:
methodology and clinical applications
Europ. J. Clin. Investigation, 7: 503-508,
1977
- (51) Ploth, D.W., Fitz, A., Schnetzler, D.,
Seidenfeld, J., Wilson, C.B.:
Thyroglobulin-Anti-Thyroglobulin Immune
Complex Glomerulonephritis Complicating
Radiiodine Therapy
Clin. Immunol. and Immunopathology, 9:
327-334, 1978
- (52) Pinchera, A., Mariotti, S., Vitti, P., Tosi, M.,
Grasso, L., Pacini, F., Buti, R.,
Baschieri, L.:
Interference of Serum Thyroglobulin in
the Radioassay for Serum Antithyroglobulin
Antibodies
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45: 1077-1088,
1977
- (53) Riesco, G., Bernal, J., Sanchez-Franco, F.:
Thyroglobulin Defect in a Human Congenital
Goiter
J. Clin. Endocrinol. Metab., 38: 33-41,
1973
- (54) Roitt, I.M., Torrigiani, G.:
Identification and Estimation of Unde-
graded Thyroglobulin in Human Serum
Endocrinology, 81: 421-429, 1967

- (55) Roitt, I.M., Doniach, D., Campbell, P.N.,
Hudson, R.V.:
Antibodies in Hashimoto's disease
(lymphadenoid goitre)
Lancet II, 820-821, 1956
- (56) Roitt, I.M., Doniach, D.:
Human Auto-Immune Thyroiditis:
Serological Studies
The Lancet, 1027-1033, 1958
- (57) Roitt, I.M., Ling, N.R., Doniach, D.,
Couchmann, K.:
The cytoplasmic auto-antigen of human-
thyroid
I. Immunological and biochemical
characteristics
Immunology I, 375-393, 1964
- (58) Salabé, G.B., Fontana, S., Andreoli, M.:
Radioimmunoassay for Human Antithyroglobulin
Antibodies
I. The Relationship Between Tanned Cell
Haemagglutination and a Double Antibody
Technique
Hormones, 3: 1-13, 1972
- (59) Salabé, G.B., Salabé, H., Dominici, R.,
Davoli, C., Andreoli, M.:
Radioimmunoassay for Human Antithyroglobu-
lin Antibodies
II. Determination of Antigen-Binding-
Capacity
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 1125-1132,
1974

- (60) Salvatore, G., Salvatore, M., Cahnmann, H.J.,
Robbins, J.:
Separation of Thyroidal Iodoproteins and
Purification of Thyroglobulin by Gel Fil-
tration and Density Gradient Centrifugation
J. Biolog. Chem., 239/10: 3267-3274, 1964
- (61) Schlossberg, A.H., Jacobson, J.C., Ibbertson,
H.K.:
Serum Thyroglobulin In The Diagnosis And
Management Of Thyroid Carcinoma
Clin. Endocrinol., 10: 17-27, 1979
- (62) Schneider, A.B., Pervos, R.:
Radioimmunoassay of Human Thyroglobulin:
Effect of Antithyroglobulin Autoantibodies
J. Clin. Endocrinol. Metab., 47/1:
126-137, 1978
- (63) Sonoda, S., Schlamowitz, M.:
Studies Of ^{125}J Trace Labeling Of Immuno-
globulin G By Chloramine-T
Immunochemistry, 7: 885-898, 1970
- (64) Suzuki, S., Mitsunaga, M., Miyoshi, M. et al.:
Cytophilic antithyroglobulin antibody and
antibody-dependent monocyte-mediated
cytotoxicity in Hashimoto's thyroiditis
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51/3:
446-453, 1980
- (65) Takeda, Y., Thomas, S., Johnson, G., Kriss, J.P.:
Purification of Human Anti-Thyroglobulin
J. Clin. Endocrinol. Metab., 41: 738-743,
1975

- (66) Torrigiani, G., Roitt, I.M., Doniach, D.:
Quantitative Distribution Of Human Thyro-
globulin Autoantibodies In Different
Immunoglobulin Classes
Clin. exp. Immunol., 3: 621-630, 1968
- (67) Vivian, S.R., La Bella, F.S.:
Classic Bioassay Statistical Prozedures
Applied to Radioimmunoassay of Bovine
Thyrotropin Growth Hormon and Prolactin
J. Clin. Endocr. 33: 225, 1971
- (68) Walker, W.H.C.:
An Approach to Immunassay
Clin. Chemistry 23, 2: 384-402, 1977
- (69) Wilkin, T.J., Beck, J.S., Gunn, A. et al.:
Autoantibodies in thyrotoxicosis:
A quantitative study of their behavior in
relation to the course and outcome of
treatment
J. Endocrinol. Invest., 3/1: 5-14, 1980
- (70) Williams, C.A., Chase, M.W.:
Methods in Immunochemistry and Immunology
Acad. Press., New York, Bd. 5, 1971
- (71) Wilson, C.B., Dixon, F.J.:
The renal response to immunological injury
In: Brenner and Rector (Eds)
The Kidney
London, New York, Vol. 2: 838, 1976
- (72) Witebsky, E., Rose, N.R.:
Studies of organ spezifity
IV Production of rabbit thyroid antibo-
dies in the rabbit
j. Immunology 76: 408-416, 1956

Lebenslauf

14. Dezember 1947 geboren in Würzburg

Vater: Dipl. Chemiker (verstorben 1954)

Mutter: Schauspielerin, geb. Coenen

1954-56 Rotbuchenschule München (Volksschule)

1957-60 v. Bonhoeffer-Grundschule, Berlin

1960-65 Mathematisch Naturwissenschaftliches
Klenze-Gymnasium, München

1965-68 Staatliches Landschulheim, Marquartstein
Abitur

1969-75 Studium der Chemie und Naturwissenschaften
an der Ludwig-Maximilians-Universität
in München

1976 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München

1976-77 Diplomarbeit am Institut für Physiologische
Chemie und physikalische Biochemie der
Universität München

1977 Ärztliche Vorprüfung

1981 Medizinisches Staatsexamen, Approbation

